

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA LEITOLIS

CARACTERIZAÇÃO DE ENXERTOS VALVARES PORCINOS OBTIDOS POR DOIS
PROCESSOS DE DESCELULARIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SUA
BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* USANDO CÉLULAS HUMANAS E VESÍCULAS
EXTRACELULARES

CURITIBA

2019

AMANDA LEITOLIS

CARACTERIZAÇÃO DE ENXERTOS VALVARES PORCINOS OBTIDOS POR DOIS
PROCESSOS DE DESCELULARIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SUA
BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* USANDO CÉLULAS HUMANAS E VESÍCULAS
EXTRACELULARES

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Correa Dominguez

Coorientador: Prof. Dr. Marco Augusto Stimamiglio

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Leitolis, Amanda

Caracterização de enxertos valvares porcinos obtidos por dois processos de descelularização e avaliação da sua biocompatibilidade *in vitro* usando células humanas e vesículas extracelulares. / Amanda Leitolis. – Curitiba, 2019.

126 p.: il.

Orientador: Alejandro Correa Dominguez

Coorientador: Marco Augusto Stimamiglio

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Valvas cardíacas 2. Próteses valvulares cardíacas 3. Vesículas extracelulares I. Título II. Dominguez, Alejandro Correa III. Stimamiglio, Marco Augusto IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.12



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **AMANDA LEITOLIS** intitulada: **Caracterização de enxertos valvares porcinos obtidos por dois processos de descélularização e avaliação da sua biocompatibilidade *in vitro* usando células humanas de vesículas extracelulares**, sob orientação do Prof. Dr. ALEJANDRO CORREA DOMINGUEZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Outubro de 2019.


ALEJANDRO CORREA DOMINGUEZ
Presidente da Banca Examinadora




GIORDANO WOSGRAU CALLONI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)


FABIOLA BARBIERI HOLETZ
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)


LUCAS FREITAS BERTI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO
PARANÁ)


TÁRCIO TEODORO BRAGA
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS)

Dedico este trabalho ao meu
amado afilhado, Artur.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família, meus pais Ana e Nelson, meus irmãos Juliana e André, meu cunhado Edvaldo e minha avó Nizete, pelo apoio, zelo, orações e compreensão ao longo de todos os anos que dediquei à minha formação. Um agradecimento especial ao meu afilhado Artur, pelo imenso carinho e por todos os dias alegrar o meu coração.

Ao meu companheiro de jornada e melhor amigo, William, pela presença, dedicação, incentivo e amor, e a minha nova família, Rute e Max, pelo cuidado, carinho e apoio durante os últimos anos.

Aos meus queridos orientadores, Alejandro e Marco. Gratidão pela confiança depositada em mim, pelo tempo e paciência investidos na minha orientação e pela convivência repleta de leveza e alegria ao longo de todos esses anos.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Anny, Ari, Bruna, Cris, Isa, Jhonatam, Letícia, Rubens, Thamile e demais integrantes do LABCET pela convivência diária, auxílio nos experimentos e por deixarem essa caminhada mais divertida e alegre. Um agradecimento especial à Cíntia e à Juli pelo auxílio nos experimentos e na redação desta tese, pela amizade que me dedicam e por me inspirarem todos os dias como pessoas e profissionais.

As egressas do laboratório, Marina e Addeli pelo acolhimento, convivência e participação direta nos experimentos desenvolvidos neste trabalho.

À minha amiga e incentivadora Sandra Crestani, gratidão pela sua amizade. Quanto mais o tempo passa, mais sei que posso contar com você.

Aos meus orientadores e demais pesquisadores do LABCET, Bruno Dallagiovanna, Patrícia Shigunov e Alessandra Aguiar, pelos ensinamentos, por compartilharem suas experiências, por serem exemplos de respeito e amor à carreira científica e proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável para os seus alunos.

A Deus e a todos aqueles que não podem estar fisicamente presentes, mas cujo amor e trabalho auxiliam nosso desenvolvimento ao longo desta vida.

Aos que colaboraram com a realização desta tese, Paula H. Suss e João Gabriel Roderjan pelas experiências transmitidas, em especial com relação à parte técnica deste trabalho. Assim como, os demais colaboradores do NEC-PUCPR.

À Pryscilla Fanini Wowk e ao Allan Cataneo pelo tempo investido e por terem me auxiliado nos experimentos de avaliação de resposta imune celular.

Aos pesquisadores Dr. Giordano Calloni, Dra. Fabíola Holetz, Dr. Tércio Braga, Dr. Lucas F. Berti, Dra. Andréa Ávila e Dra. Lia S. Nakao que gentilmente aceitaram compor a banca de avaliação deste trabalho.

A rede de plataformas tecnológicas da FIOCRUZ. Em especial a plataforma de microscopia do ICC, com a qual contei para a realização de grande parte deste trabalho, e as suas colaboradoras Tabata Klimeck e a Bruna Marcon.

Aos colaboradores do ICC, como a equipe de logística, TI, manutenção, limpeza e preparo de soluções.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR.

A CAPES, CNPq e APC cujos recursos permitiram o desenvolvimento deste estudo.

E por fim agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Sua visão se tornará clara somente quando você olhar para dentro do seu coração. Quem olha pra fora, sonha. Quem olha pra dentro, desperta.”

Carl Jung

RESUMO

Doenças de válvula cardíaca (DCV) ou valvopatias são termos utilizados para designar tipos diferentes de problemas que podem afetar a funcionalidade de qualquer uma das quatro válvulas do coração. A principal forma de tratamento para portadores de DVC é a cirurgia de substituição valvar, um procedimento no qual são aplicados substitutos valvares como as próteses biológicas. A descelularização, técnica para remoção do conteúdo celular tecidual e retenção da estrutura da matriz extracelular (MEC), é uma das estratégias para o desenvolvimento de próteses viáveis, não imunogênicas e funcionais. Neste trabalho, válvulas cardíacas pulmonares porcinas foram descelularizadas utilizando uma solução de 0,1% SDS e 0,02% EDTA (grupo VPD-S) ou através da utilização desta mesma solução seguida de exposição à solução hipertônica e incubação com 20 U/mL de Benzonase (grupo VPD-B). Após os tratamentos, a eficiência de descelularização de cada protocolo foi avaliada por meio da extração e quantificação de DNA residual dos tecidos. Além disso, a MEC valvar foi caracterizada e avaliada quanto ao seu potencial citotóxico, imunogênico e de biocompatibilidade com células humanas. Posteriormente, vesículas extracelulares derivadas de explante cardíaco (hH-EVs) foram caracterizadas fisicamente, tiveram seu conteúdo proteico analisado por espectrometria de massa (MS) e foram avaliadas quanto (1) a sua capacidade de influenciar a adesão, migração, proliferação e angiogênese de células endoteliais (HUVEC) e de células-tronco mesenquimais (CTMs); e (2) de favorecer a recelularização de válvulas descelularizadas. Nossos resultados mostraram que os enxertos do grupo VPD-S apresentaram aproximadamente 40% menos DNA no conduto e no músculo valvar, e não alteraram a quantidade de DNA das cúspides em comparação ao controle nativo, ao passo que nos enxertos do grupo VPD-B a remoção do DNA das válvulas foi superior a 93%. Entretanto, nesse último grupo, maiores alterações na MEC valvar foram verificadas. Nenhum dos enxertos foi citotóxico ou capaz de induzir a proliferação de células imunes *in vitro*. Em ensaios de biocompatibilidade *in vitro*, tecidos VPD-S co-cultivados com CTMs apresentaram recelularização significativamente maior que VPD-B após 7 e 15 dias. Entretanto, a recelularização com células intersticiais de válvula cardíaca (VIC) foi semelhante em ambos os grupos. Quanto às hH-EVs, a análise por MS identificou um total de 1248 proteínas e a análise de ontologia gênica (GO) revelou proteínas envolvidas em processos como, regulação da morte celular e a resposta à cicatrização. Além disso, hH-EVs foram capazes de estimular a migração e diminuir a adesão de CTMs, além de induzir a proliferação e a angiogênese *in vitro* de HUVEC. Quando testadas em modelo de co-cultivo, as hH-EVs aumentaram significativamente a recelularização de válvulas descelularizadas com CTMs após 3 e 7 dias. Em resumo, esse conjunto de dados demonstra que os protocolos de descelularização resultaram em próteses valvares não tóxicas, com quantidades reduzidas de DNA e receptivas a recelularização com células humanas. Além disso, os dados obtidos confirmam que as hH-EVs são capazes de modular processos celulares e são úteis para aplicação em engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Válvula cardíaca 1. Descelularização 2. Vesículas extracelulares 3.

ABSTRACT

Heart valve diseases (HVD) comprise different types of problems that may affect the functionality of the heart valves. The main treatment for patients with HDV is valve replacement surgery, a procedure in which valve substitutes, such as biological prostheses, are applied. Decellularization, a technique for removing cell content from a tissue while maintain the extracellular matrix (ECM) structure, is one of the strategies for the development of viable, non-immunogenic and functional prostheses. In this work, porcine pulmonary heart valves were decellularized using a 0.1% SDS and 0.02% EDTA solution (VPD-S group) or using the same solution followed by exposure to hypertonic solution and incubation with 20 U/mL of Benzonase (VPD-B group). After the treatments, the decellularization efficiency of each protocol was evaluated by DNA extraction and quantification. The decellularized ECMs were characterized and analyzed to determine their cytotoxicity, immunogenicity and biocompatibility with human cells. Subsequently, heart explant-derived extracellular vesicles (hH-EVs) were physically characterized and the protein content in these particles was evaluated by mass spectrometry (MS). The potential of hH-EVs to (1) induce proliferation, adhesion, angiogenesis and wound healing in mesenchymal stem-cells (MSC) and endothelial cells (HUVEC), as well as, the potential to (2) improve the recellularization of decellularized valves was investigated *in vitro*. Our results showed that the VPD-S group grafts presented 40% less DNA in conduit and muscle of valve in comparison to the native control. On the other hand, the procedure used in VPD-B group led to DNA reduction greater than 93%. However, in VPD-B valves major changes in ECM structure were observed. Also, both grafts produced were non-cytotoxic and were unable to induce proliferation of immune cells *in vitro*. *In vitro* biocompatibility assays showed that VPD-S tissues co-cultured with MSCs presented significantly greater recellularization than VPD-B after 7 and 15 days. However, recellularization with valve interstitial cells (VIC) was similar between groups. For hH-EVs, MS analysis identified a total of 1248 proteins and the gene ontology (GO) analysis revealed proteins involved in processes such as cell death regulation and wound healing response. In addition, hH-EVs were able to induce proliferation and angiogenesis in HUVEC, improve wound healing and reduce MSC adhesion. Last, we showed that hH-EVs were able to significantly promote MSC recellularization of decellularized valves after 3 and 7 days. In summary, our data demonstrates that decellularization protocols generated porcine valve prostheses with reduced amounts of DNA, non-cytotoxic and able to be recellularized with human cells. In addition, the data confirm the potential of hH-EVs to modulate cellular processes and for tissue engineering applying.

Keywords: Heart valve 1. Decellularization 2. Extracellular vesicles 3.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.1 Anatomia do coração humano.	14
Figura 1.2 Anatomia funcional das válvulas cardíacas semilunares..	15
Figura 1.3 Estrutura e componentes das válvulas cardíacas.	16
Figura 1.4 Doenças de válvula cardíaca.	19
Figura 1.5 Tipos de próteses valvares..	21
Figura 1.6. Conteúdo vesicular e formas de interação entre as vesículas extracelulares e as células alvo.....	31

CAPÍTULO I

Figura 2.1 Quantificação do DNA residual extraído das três regiões valvares após a descclularização pelo protocolo de etapa única (VPD-S) e protocolo combinado (VPD-B) em comparação a válvulas nativas não descclularizadas (VPN).....	46
Figura 2.2. Eletroforese em gel de agarose 1% realizada com DNA extraído de amostras, sem <i>spike</i> , de cúspide (CS), conduto (CO) e músculo (MS) dos grupos descclularizados pelo protocolo de etapa única (VPD-S) e protocolo combinado (VPD-B) em comparação a válvulas nativas não descclularizadas (VPN). M.....	46
Figura 2.3. Cortes histológicos de válvulas nativas e descclularizadas corados com H&E e DAPI.....	48
Figura 2.4. Detecção do antígeno alfa-Gal utilizando Isolectina B4..	49
Figura 2.5. Imunofluorescência para detecção de vimentina nas cúspides e condutos valvares nativos e descclularizados..	49
Figura 2.6. Imunofluorescência para detecção de elastina nas cúspides e condutos valvares nativos e descclularizados.	50
Figura 2.7. Imunofluorescência para detecção de colágeno I nas cúspides e condutos valvares nativos e descclularizados.....	51
Figura 2.8. Secções de válvulas cardíacas coradas com PAS/Alcian Blue para marcação de GAG.....	52
Figura 2.9. Análise ultraestrutural da matriz de válvulas nativas e descclularizadas.	53
Figura 2.10. Ensaios de citotoxicidade com válvulas porcinas nativas e descclularizadas.....	54
Figura 2.11. Ensaio de proliferação de PBMCs.....	55

Figura 2.12. Avaliação da capacidade de células-tronco mesenquimais em recelularizar cúspides valvares descelularizadas.....	56
Figura 2.13. Recelularização de cúspides descelularizadas com células-tronco mesenquimais.	57
Figura 2.14. Avaliação quantitativa da colonização de cúspides descelularizadas por células-tronco mesenquimais.	58
Figura 2.15. Marcação da proliferação de células-tronco mesenquimais em tecidos recelularizados utilizando anticorpo anti-ki67.	59
Figura 2.16. Imunofluorescência para verificação da presença de pró-colágeno I nas células-tronco mesenquimais aderidas aos tecidos descelularizados.....	59
Figura 2.17. Análise da transição do fenótipo qVIC para aVIC induzido pela substituição do meio de cultivo.....	61
Figura 2.18. Recelularização de cúspides descelularizadas com células intersticiais de válvula cardíaca	62
Figura 2.19. Avaliação quantitativa da colonização de cúspides descelularizadas por células intersticiais de válvula cardíaca.....	62

CAPÍTULO II

Paper hH-EVs Figure 1. Characterization of hH-EVs.....	75
Paper hH-EVs Figure 2. Protein identification and functional enrichment analysis of human heart-derived extracellular vesicles (hH-EVs).....	77
Paper hH-EVs Figure 3. Influence of hH-EVs derived from cardiac regions on human adipose- derived stem cell (ADSC) and human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) adhesion.....	79
Paper hH-EVs Figure 4. Influence of hH-EVs derived from cardiac regions on ADSC and HUVEC wound healing.....	80
Paper hH-EVs Figure 5. Influence of hH-EVs derived from cardiac regions on ADSC and HUVEC proliferation.	81
Paper hH-EVs Figure 6. In vitro angiogenesis assay of HUVECs cultured for 24 h on a Matrigel layer under the influence of hH-EVs derived from cardiac regions.	82
Paper hH-EVs Figure 7. Extracellular vesicles derived from LVE affect scaffold recellularization.	83
Paper hH-EVs Figure 8. Isolation of heart-derived extracellular vesicles. samples were dissociated in fragments of 3 mm ² and culture for human heart-derived extracellular vesicles (hH-EVs) and cardiac cells isolation.....	89

Paper hH-EVs Figure S1 Standardization of the cell adhesion assay performed with ADSC cells..	95
Paper hH-EVs Figure S2. Analysis of the efficiency of decellularization.	95
Paper hH-EVs Figure S3. Representative images of recellularized fragments previously coated with 10 µg/ml LVE-EVs and cultivated with ADSCs for 24h; and recellularized fragments cultivated with ADSCs for 24h, stimulated with 10 µg/ml LVE-EVs and then cultivated for 3 and 7 days..	96
Paper hH-EVs Figure S4. Representative graphic from NTA images of FBS and dFBS.	97

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1-1 Critérios para o desenvolvimento de uma VCET ideal.....	23
---	----

CAPÍTULO I

Tabela 2-1 Porcentagem de células isoladas da válvula mitral positivas para os marcadores nas passagens 2 e 7.	60
--	----

CAPÍTULO II

Paper hH-EVs Tabel 1. Explant characterization	74
Paper hH-EVs Tabel 2 Clinical information about the heart donors and the hH-EV pool construction.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADSC - Human adipose-derived stem cells

AUE- Right auricle endocardium

AUM - Right auricle myocardium

BSA - Albumina sérica bovina

BSS/CMF - Solução salina balanceada sem cálcio e magnésio

BVCHSC - Banco de Valvas Cardíacas Humanas do Hospital de Caridade da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba

CDCs - Cardiosphere-derived cells

CDH13 - Cadherin 13

CEUA - Comitê de Ética no uso de animais

CFSE - Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CO₂ - Gás carbônico ou dióxido de carbono

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CRCS - Cardiac resident stromal cell

CTMs - Células-tronco mesenquimais

CTNNB1 - Catenin (cadherin-associated protein), beta 1

DAPI - 4',6-diamino-2-fenilindol

DCV - Doenças cardiovasculares

DHV - Decellularized heart valves

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DVC - Doenças de válvula cardíaca

EBM-2 - Endothelial Cell Growth Medium

ECM - Extracellular matrix

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EdU - 5-ethynyl-20-deoxyuridine

EVs - Extracellular vesicles

FB - Febre Reumática

FDR - False Discovery Rate

FGFb - Fator de crescimento de fibroblasto básico - beta

FITC - Isocianato de fluoresceína

GAGs - Glicosaminoglicanos

GO - Gene ontology

H&E - Hematoxilina e Eosina

hH-EVs - Human heart-derived extracellular vesicles

HSP-90 - Heat shock protein 90 kDa alpha

HUVEC - Human umbilical vein endothelial cells

ILK - Integrin-linked kinase

iPS - Induced pluripotent stem cells

ITGA1 - Integrin, alpha I

ITGA5 - Integrin, alpha V

ITGB1 - Integrin, beta I

LVE - Left ventricular endocardium

LVE-EV - Left ventricular endocardium-derived extracellular vesicles

LVM - Left ventricular myocardium

MEC - Matriz extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

miRNA - microRNA

MS - Mass spectrometer

MTL - Mitral valve leaflet

NaCl - Cloreto de sódio

NTA - Nanoparticle Tracking Analysis

PAS - Ácido periódico de Schiff

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico

PBS - Tampão fosfato salino

PHA - Fitohemaglutinina

PUCPR - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

RVE - Right ventricular endocardium

RVM - Right ventricular myocardium

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

TEM - Transmission Electron Microscopy

TrisHCl - Tris Hidroximetil Aminometano Cloridrato

VE - Vesícula Extracelular

VIC - *Valve interstitial cells*

VCET – Válvula cardíaca de engenharia de tecidos

VTN - Vitronectin

xg – Força centrífuga relativa

alfa-Gal - galactose-alfa-1,3-galactose

LISTA DE SÍMBOLOS

% - percentual

® - marca registrada

g - grama

h - hora(s)

mg - miligrama

mg/mL - miligrama por mililitro

min - minuto(s)

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - milimolar

mm² - milímetro quadrado

mm³ - milímetro cúbico

n - número de amostras

nm - nanômetro

°C - graus celsius

p - significância

rpm - rotações por minuto

s - segundo (s)

™ - trademark

U/mL – unidades por mililitro

µg - micrograma

µg/mL - micrograma por mililitro

µl - microlitro

µm - micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Breve descrição da anatomia cardíaca	13
1.2	Válvulas cardíacas	14
1.2.1	Anatomia e funcionamento	14
1.2.2	Composição celular das válvulas cardíacas	16
1.3	Valvopatias	18
1.3.1	Calcificação da válvula aórtica	20
1.4	Próteses valvares	20
1.5	Válvulas cardíacas de engenharia de tecidos	23
1.5.1	Descelularização tecidual	24
1.5.2	Xenotransplantes	26
1.5.3	Recelularização de tecidos descelularizados	26
1.5.4	Tipos celulares para recelularização valvar <i>in vitro</i>	27
1.5.4.1	Células-tronco mesenquimais	27
1.5.4.2	VIC e VEC	28
1.5.5	Utilização de moléculas bioativas em VCET	28
1.5.6	Vesículas extracelulares	29
1.5.7	Vesículas extracelulares na engenharia de tecidos	31
1.6	JUSTIFICATIVA	32
1.7	Objetivos	33
1.7.1	Objetivo Geral	33
1.7.2	Objetivos Específicos	33
2	CAPÍTULO I	34
2.1	METODOLOGIA	34
2.1.1	Aspectos éticos	34
2.1.2	Coleta e dissecação de válvulas pulmonares porcinas	34
2.1.3	Descelularização das válvulas cardíacas	35
2.1.4	Quantificação do DNA remanescente nos tecidos após a descelularização	36
2.1.5	Avaliação histológica e de imunofluorescência dos tecidos descelularizados	37

2.1.6	Avaliação ultraestrutural das válvulas por microscopia eletrônica de varredura.....	38
2.1.7	Avaliação da citotoxicidade das válvulas descelularizadas	38
2.1.8	Avaliação da resposta imune celular de PBMCs aos tecidos descelularizados	40
2.1.9	Isolamento de células intersticiais de válvula cardíaca.....	41
2.1.10	Caracterização de células intersticiais de válvula cardíaca	42
2.1.11	Avaliação da capacidade de recelularização dos tecidos descelularizados com células-tronco mesenquimais e células intersticiais de válvula cardíaca	43
2.2	RESULTADOS	45
2.2.1	Os protocolos de descelularização apresentam diferenças de eficiência na remoção do conteúdo celular e do DNA dos tecidos.....	45
2.2.2	A matriz extracelular de válvulas descelularizadas foi parcialmente preservada, as alterações observadas variaram conforme o protocolo utilizado.	50
2.2.3	As válvulas descelularizadas não apresentaram citotoxicidade	53
2.2.4	As válvulas descelularizadas não induziram a proliferação de células imunes <i>in vitro</i>	54
2.2.5	As cúspides descelularizadas funcionaram como arcabouço para adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais humanas.....	55
2.2.6	As cúspides descelularizadas funcionaram como arcabouço para adesão de células intersticiais de válvula cardíaca humana.....	60
2.3	DISCUSSÃO	63
3	CAPÍTULO II	70
3.1	ABSTRACT	71
3.2	INTRODUCTION	71
3.3	RESULTS	73
3.3.1	Explant Characterization: Cells Derived from Different Heart Regions Are Similar and Heterogeneous.....	73
3.3.2	Characterization and Prospective Functional Analysis of Human Heart-Derived Extracellular Vesicles (hH-EVs)	74
3.3.3	hH-EVs stimulate directional cell migration and decrease the adhesion capabilities of ADSCs	78
3.3.4	hH-EVs stimulate proliferation and the <i>in vitro</i> angiogenesis of HUVECs.....	80

3.3.5	Effect of LVE-EVs on leaflet scaffold recellularization	82
3.4	DISCUSSION	84
3.5	MATERIALS AND METHODS	87
3.5.1	Ethics Statements	87
3.5.2	The Culture and Characterization of the Explants	88
3.5.3	Isolation of Heart-Derived Extracellular Vesicles	88
3.5.4	hH-EV characterization by Nano Tracking Analysis, Transmission Electron Microscopy and Mass spectrometry analysis.	90
3.5.5	ADSC and HUVEC cultures.....	91
3.5.6	Cell proliferation assay	91
3.5.7	Cell adhesion assay.....	91
3.5.8	Scratch wound-assay	92
3.5.9	In vitro angiogenesis assay	92
3.5.10	Decellularization of porcine heart valves	93
3.5.11	In vitro porcine valve leaflet scaffold recellularization	93
3.5.12	Statistical analysis	94
3.5.13	Acknowledgments.....	94
3.6	SUPPLEMENTARY MATERIAL	95
3.7	REFERENCES	98
4	DISCUSSÃO GERAL	102
5	CONCLUSÕES	105
6	REFERÊNCIAS	106
ANEXO A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA		120
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido		124

1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE DESCRIÇÃO DA ANATOMIA CARDÍACA

O coração humano, órgão central do sistema cardiovascular, está situado no tórax acima do diafragma, na região do mediastino, espaço localizado entre os dois pulmões. Internamente esse órgão apresenta quatro câmaras sendo elas, dois átrios (átrio direito e átrio esquerdo) posicionados na margem superior que funcionam como câmaras coletoras recolhendo o sangue que retorna ao coração, e dois ventrículos (ventrículo direito e ventrículo esquerdo), posicionados na margem inferior que trabalham para bombear o sangue para fora do coração. Em conjunto, tais câmaras desempenham a função primordial desse órgão, coletar sangue desoxigenado, bombeá-lo para os pulmões e devolver o sangue oxigenado para todos os tecidos do corpo (Anderson 2002; Weinhaus & Roberts 2005). A estrutura histológica do coração é composta por três camadas: o endocárdio, o miocárdio e o pericárdio. O endocárdio é a camada mais interna que permite o deslizamento do sangue dentro das cavidades desse órgão, ele é formado por células endoteliais organizadas sobre uma fina camada de membrana basal. O miocárdio, por sua vez, desempenha a função contrátil do coração, ele é formado principalmente por cardiomiócitos, células que se unem e se ramificam formando as fibras do músculo cardíaco. Por fim, o pericárdio compreende a camada que envolve o coração externamente e é formada essencialmente por tecido conjuntivo e células mesoteliais (Anderson 2002; Weinhaus & Roberts 2005). No que diz respeito à vasculatura, o coração apresenta vasos que conduzem o sangue para dentro e para fora das câmaras, sendo eles, a artéria tronco pulmonar, a artéria aorta, as veias pulmonares e as veias cavas, superior e inferior (Figura 1.1). Adicionalmente, o coração tem seu sistema de irrigação próprio, formado pelas artérias coronárias (direita e esquerda), seio coronário e as veias cardíacas.

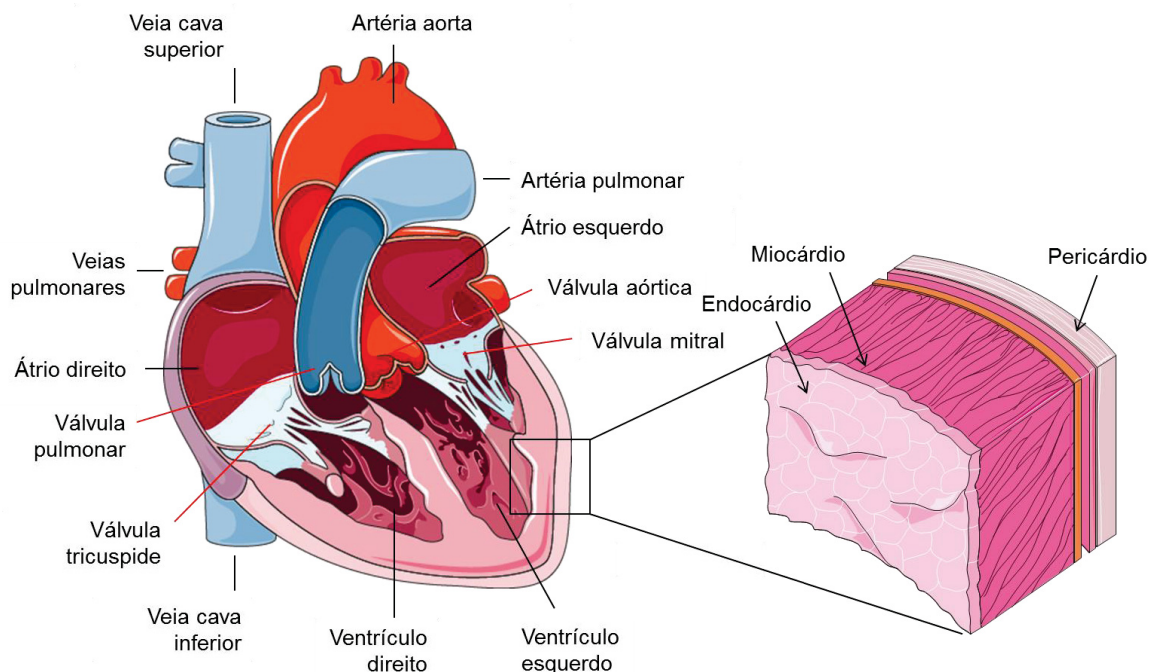


Figura 1.1 Anatomia do coração humano. A imagem ilustra a posição das câmaras cardíacas, vasculatura, válvulas e camadas cardíacas que formam o coração. Fonte: modificado de <http://smart.servier.com/>

1.2 VÁLVULAS CARDÍACAS

1.2.1 Anatomia e funcionamento

Internamente, as câmaras cardíacas são separadas por quatro válvulas, duas delas posicionadas entre os átrios e ventrículos conhecidas como atrioventriculares (válvula tricúspide e válvula bicúspide ou mitral), e outras duas posicionadas separando os ventrículos das grandes artérias, denominadas semilunares (válvula aórtica e válvula pulmonar) (Anderson 2002) (Figura 1.1). Essas estruturas permitem que o sangue flua unidirecionalmente - sem fluxo retrógrado - no interior do coração. As válvulas atrioventriculares impedem o retorno do sangue dos ventrículos para os átrios durante a sístole, enquanto que as válvulas semilunares evitam o retorno sanguíneo das artérias para os ventrículos durante a diástole (Schoen 2016).

As válvulas semilunares estão localizadas no ramo aórtico (válvula aórtica) e no ramo pulmonar (válvula pulmonar), regiões que compreendem o espaço entre a junção sinotubular e a junção ventrículo-atrial (ânulo). No interior dessas estruturas são encontrados três tecidos delgados denominados folhetos ou cúspides. As cúspides são as estruturas funcionais das válvulas cardíacas, elas estão fixadas na

parede dos ramos aórtico/pulmonar, unidas uma à outra pelas comissuras e posicionadas sobre os seios de valsalva (Cheung, Duan & Butcher 2015; Hinton & Yutzey 2011) (Figura 1.2 A). Quando as válvulas cardíacas são dissecadas para aplicação clínica ou estudos experimentais nos quais o objetivo é utilizá-las como enxerto, é comum que sejam removidos juntamente com os ramos aórtico/pulmonar, uma porção da aorta ascendente (válvula aórtica) ou do tronco pulmonar (válvula pulmonar) que passam a ser denominados como condutos valvares (Figura 1.2 B). Do mesmo modo, a região de inserção das artérias aos ventrículos, formada por músculo cardíaco é também mantida na disseção valvar (Figura 1.2 B). Essas porções são preservadas a fim de garantir a integridade das cúspides durante a dissecação e para fornecer espaço suficiente para a realização de sutura no caso de um transplante valvar. A principal função dos condutos valvares é conectar o coração à circulação sistêmica, conexão essa que é controlada pelo movimento de abertura e fechamento das cúspides (Charitos & Sievers 2013; Schoen 2016).

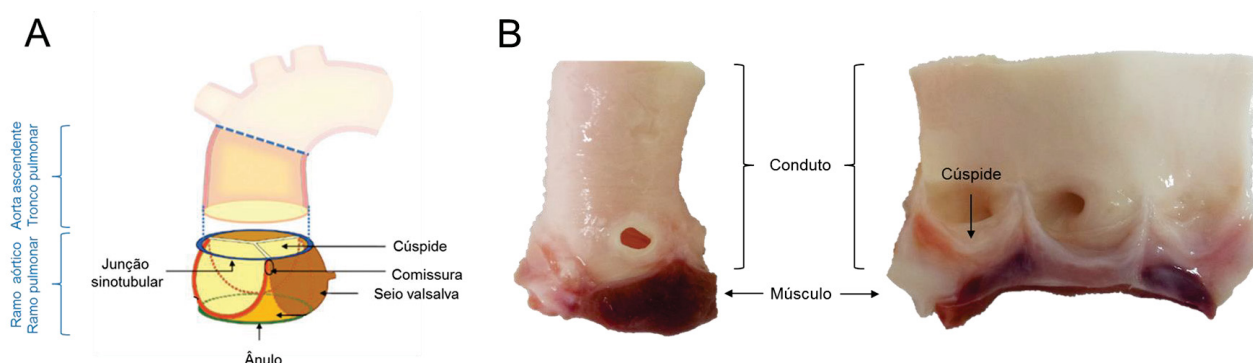


Figura 1.2 Anatomia funcional das válvulas cardíacas semilunares. (A) Os ramos aórtico e pulmonar são regiões das artérias, aorta e pulmonar, que contém as estruturas complexas formadoras das válvulas cardíacas: junção sinotubular, anulo, seios de valsalva, comissuras e cúspides. FONTE: Extraído de Charitos *et al*, 2013. (B) Imagens de uma válvula aórtica dissecada mostrando as porções do conduto e do músculo cardíaco e de uma válvula aórtica aberta para a visualização das três cúspides.

Estima-se que as cúspides abram e fechem cerca de 40 milhões de vezes ao longo de um ano totalizando aproximadamente 3 bilhões de movimentos em 80 anos de vida (Schoen 2016). Tal funcionamento só é possível devido à complexa macro e microestrutura desses tecidos. De modo geral todas as quatro válvulas apresentam cúspides com uma arquitetura similar formada por três camadas: fibrosa, esponjosa e ventricular (Figura 1.3). A primeira é constituída por uma densa camada de colágeno, a segunda é composta principalmente por glicosaminoglicanas (GAG) e a última por elastina (Latif *et al.* 2005), essas moléculas correspondem a

aproximadamente 60%, 30% e 10% do conteúdo da matriz extracelular (MEC) das cúspides valvares, respectivamente (Kunzelman et al. 1993). Durante o ciclo cardíaco, o colágeno é rearranjado achatando-se durante a sístole e alinhando-se a cada diástole, enquanto a elastina proporciona a abertura rápida das cúspides e os proteoglicanos amortecem o choque causado pela pressão sanguínea (Schoen 2016).

1.2.2 Composição celular das válvulas cardíacas

Em todas as camadas das cúspides estão presentes células mesenquimais conhecidas como células intersticiais de válvula cardíaca (do inglês *Valve interstitial cells*) (VIC) e, revestindo o tecido, há uma faixa de células endoteliais de válvula cardíaca (do inglês *Valve Endothelial Cells*) (VEC) (Cheung et al. 2015) (Figura 1.3). Essas células configuram o componente celular principal das válvulas cardíacas, são responsáveis por manter a integridade do tecido e tem sido amplamente estudadas por conta do seu envolvimento no processo de calcificação valvar (Bogdanova et al. 2018; Rutkovskiy et al. 2017). VIC e VEC podem ser isoladas a partir de doadores saudáveis cujos tecidos foram considerados inadequados para o transplante ou até mesmo a partir de válvulas removidas de pacientes com anormalidades congênitas ou que apresentam insuficiência valvar (Rutkovskiy et al. 2017). O isolamento das células valvares pode ser realizado tanto a partir de explantes de válvulas dissecados e colocados em cultura, quanto por meio da digestão da MEC valvar e subsequente cultivo da suspensão celular (Hjortnaes et al. 2015).

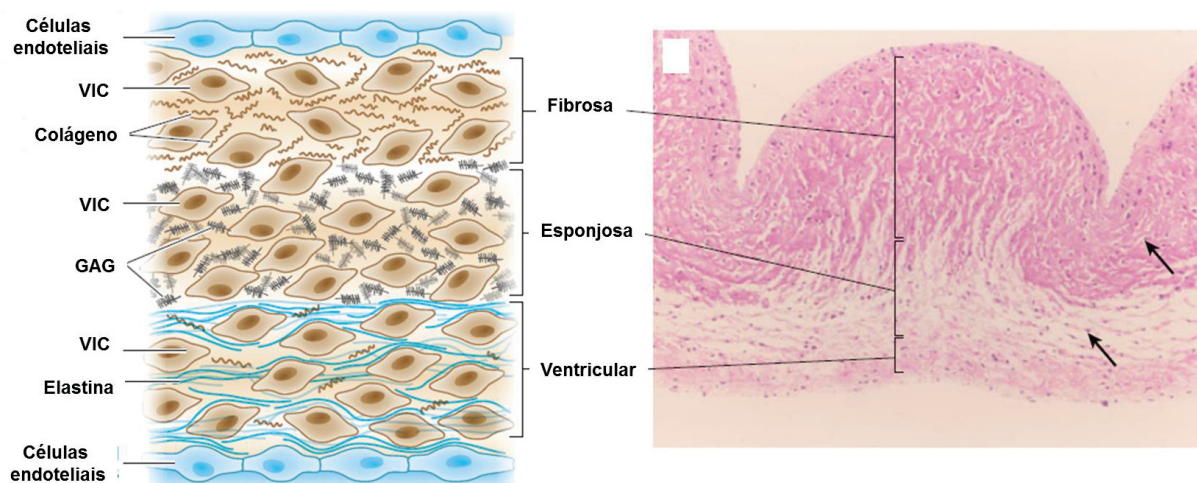


Figura 1.3 Estrutura e componentes das válvulas cardíacas. FONTE: Extraído de Schoen, 2012.

Quanto às características fenotípicas e moleculares destas células, observa-se que, em cultivos de monocamada, as VIC apresentam morfologia alongada semelhante a fibroblastos e comumente são caracterizadas pela expressão dos seguintes marcadores: alfa-actina de músculo liso (alfa-SMA), miosina de músculo liso, vimentina e desmina (Meng et al. 2008; Messier et al. 1994). Entretanto, os níveis de expressão de cada marcador podem variar de acordo com características como, idade e histórico de saúde dos doadores, assim como pelos processos de diferenciação que podem ocorrer nessas células (Rutkovskiy et al. 2017). De fato, VIC apresentam fenótipo reversível e dinâmico, elas podem diferenciar-se *in vitro* em adipócitos e condrócitos (Chen et al. 2009) além de miofibroblastos e osteoblastos (Rutkovskiy et al. 2017), sendo esse último muito importante no processo de calcificação valvar que será discutido mais adiante. Anteriormente, Liu e colaboradores (2007) sugeriram cinco fenótipos que melhor representam a família de VIC, sendo eles: células progenitoras endoteliais/mesenquimais embrionárias, VIC quiescente (qVIC), VIC ativada (aVIC), progenitor VIC (pVIC) e VIC osteoblástica (obVIC), cada qual exibindo um conjunto específico de funções celulares na fisiologia normal e patológica de válvulas cardíacas.

Por sua vez, as VEC compreendem células endoteliais contínuas ao endocárdio que compartilham dos mesmos marcadores encontrados em todos os endotélios, tais como: CD31, von Willebrand e Ve-caderina (Farrar & Butcher 2015; Osman et al. 2006). Entretanto, como residem em um ambiente mecânico muito particular são consideradas um tipo especial de célula endotelial (Mongkoldhumrongkul, Yacoub, and Chester 2016). Foi previamente reportado, por exemplo, que quando submetidas a estresse de cisalhamento *in vitro*, as VEC mantêm seu alinhamento perpendicular ao fluxo, enquanto células endoteliais isoladas de aorta alinham-se paralelamente frente ao mesmo estímulo, evidenciando uma diferença morfológica importante entre células endoteliais vasculares e células endoteliais valvares (Butcher et al. 2004). Mesmo dentro do grupo de VEC, observa-se que as células sobre a camada ventricular apresentam morfologia escamosa enquanto que as células sobre a camada fibrosa apresentam morfologia cuboide (Butcher & Nerem 2006). É importante ressaltar, que durante a embriogênese as células endoteliais que recobrem as cúspides primitivas, migram para dentro do espaço subendocárdico e dão origem as VIC através do processo de transição endotélio-mesenquimal (Butcher & Markwald 2007). Ainda não está claro se as VEC

podem ser renovadas por progenitores endoteliais circulantes ao longo da vida, entretanto, já foi demonstrado que pacientes com disfunção valvar apresentam alterações no número e funcionamento de tais progenitores (Vaturi et al. 2011). Em suma, as VEC mantêm a homeostase tecidual regulando a permeabilidade, a adesão de células inflamatórias e a sinalização parácrina no ambiente valvar (Yutzey et al. 2014). Como mencionado anteriormente, os condutos valvares são formados pelo tronco da artéria pulmonar e pela aorta ascendente, desse modo, apresentam as três camadas principais comuns a todos os vasos sanguíneos: túnica íntima, túnica média e túnica adventícia. Essas camadas são formadas respectivamente por células endoteliais, células musculares lisas, e fibroblastos (Bäck et al. 2013).

1.3 VALVOPATIAS

Doenças de válvula cardíaca (DVC), valvopatias ou valvulopatias são termos utilizados para designar tipos diferentes de problemas que podem afetar a funcionalidade de qualquer uma das quatro válvulas do coração. Tais problemas podem ser categorizados em três tipos principais: regurgitamento, atresia e estenose (NHI, 2015) (Figura 1.4). No regurgitamento o fechamento da válvula torna-se incompleto resultando em retorno do sangue para a câmara cardíaca anterior. Na maior parte dos casos essa disfunção decorre de um abaulamento das cúspides denominando prolapso, uma alteração que incide principalmente sobre a válvula mitral (Althunayyan et al. 2019). Já a atresia é definida como uma cardiopatia congênita na qual há ausência de conexão entre as câmaras cardíacas ou observa-se o desenvolvimento de uma válvula anormal (Zielinsky 1997). E por fim, a estenose é uma disfunção valvar degenerativa caracterizada pelo estreitamento do orifício valvar decorrente de calcificação severa, fibrose e deposição de lipídeos nas cúspides (Choi & Lee 2016). De modo geral, os indivíduos portadores de DVC são assintomáticos para essa condição, porém, quando não tratadas, essas doenças podem levar a insuficiência cardíaca e morte por parada cardíaca súbita (NIH, 2015).

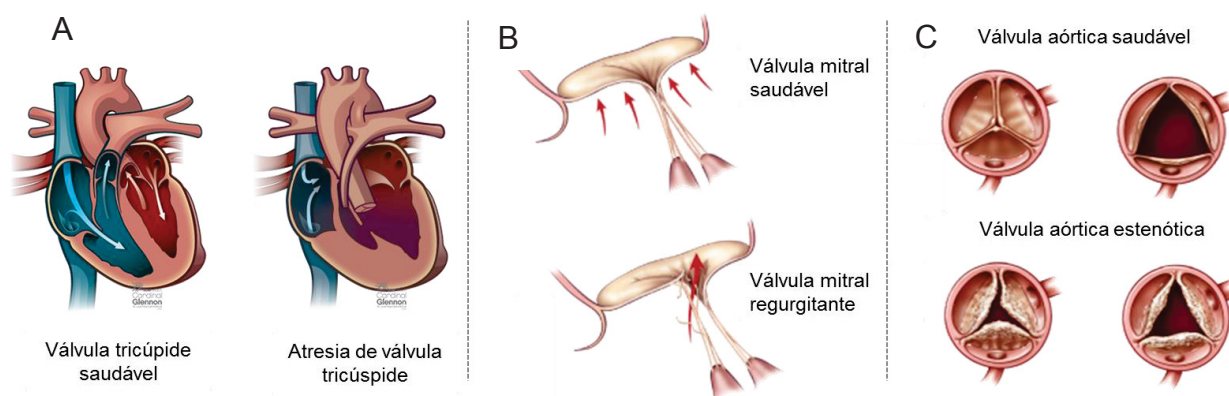


Figura 1.4 Doenças de válvula cardíaca. (A) Atresia de válvula tricúspide; (B) Válvula mitral regurgitante; (C) Válvula aórtica calcificada. FONTE: modificado de <https://www.edwards.com/patients/patient-information>

Dados do *American Heart Association* indicam que as valvopatias afetam cerca de 5 milhões de pessoas nos EUA (Go et al. 2013) e aproximadamente 100 milhões de pessoas no mundo todo (Go et al. 2014). A prevalência para essas doenças é de 2,5 %, sem diferenças significativas entre homens e mulheres (Mozaffarian et al. 2016). Das 50222 mortes causadas por DVC no ano de 2013 nos EUA, cerca de 67,5% foram decorrentes de disfunções na válvula aórtica (Mozaffarian et al. 2016). Entretanto, a maior parte dos novos casos deriva de manifestações congênicas da doença, responsável por cerca de 40 mil eventos por ano (Go et al. 2014). Dentre as causas descritas para valvopatias não congênicas, encontram-se; o envelhecimento, a febre reumática (FR), a endocardite e as miocardiopatias (Go et al. 2014). Enquanto na maior parte dos países desenvolvidos a etiologia mais frequente de DVC está associada à calcificação das válvulas em pacientes idosos, no Brasil, e demais países em desenvolvimento, a principal causa é a febre reumática (Tarasoutchi et al. 2017). A FR trata-se de uma complicação que ocorre em virtude da resposta imune tardia à infecção causada pelo estreptococo beta-hemolítico do grupo A, causador de faringoamigdalite, essa condição está associada à pobreza e más condições de vida e constitui um importante problema de saúde pública (Batista & Amaral 2009). Também estão incluídos os fatores de risco comuns a todas as doenças cardiovasculares, tais como: hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo, diabetes, obesidade e histórico familiar de doença cardiovascular (NIH, 2015).

A principal forma de tratamento para portadores de DVC é a cirurgia de substituição valvular, um procedimento realizado aproximadamente 300 mil vezes ao

ano no mundo e que, estima-se, irá aumentar em três vezes nos próximos 30 anos (Weber, Emmert, & Hoerstrup 2012; Yacoub & Takkenberg 2005). No Brasil, a correção cirúrgica de urgência é indicada para pacientes com valvopatias agudas que podem ser causadas por dissecação de aorta, isquemia, ruptura de cordoalha ou de músculo papilar e endocardite. Além disso, em indivíduos com próteses com disfunção importante o procedimento cirúrgico de retroca também é indicado (Tarasoutchi et al. 2017).

1.3.1 Calcificação da válvula aórtica

Como mencionado anteriormente mais de 60% das mortes causadas por DVC são decorrentes de disfunções na válvula aórtica (Mozaffarian et al. 2016). Nesse tipo de disfunção a válvula torna-se mais espessa, rígida, calcificada e muitas vezes coberta de nódulos na superfície voltada para a aorta (Yutzey et al. 2014).

A calcificação valvar foi considerada por muito tempo como uma deposição passiva de complexos de cálcio-fosfato. Entretanto, atualmente observa-se que esse é um processo complexo que envolve muitas etapas e uma série de mediadores (Leopold 2012). Embora tal mecanismo não esteja completamente elucidado, acredita-se que o mesmo origina-se a partir de uma disfunção endotelial, na qual há aumento na permeabilidade resultando em infiltração de células imunes e difusão inespecífica de citocinas como $TNF\alpha$, RANKL, IL1, IL-6, $TGF\beta$, isto levaria a ativação das qVIC e à regulação negativa de inibidores locais ou circulantes de calcificação (Yao et al. 2010; Yutzey et al. 2014). Após sua ativação, as qVIC podem se diferenciar em células semelhantes a miofibroblastos e em seguida expressar fenótipo osteoblástico calcificando a MEC valvar. Alternativamente as qVIC podem diferenciar-se em obVIC sem ativação miofibroblástica prévia (Yip et al. 2009). Esses eventos resultariam em neoangiogênese (Chalajour et al. 2007), remodelamento da MEC (Chen & Simmons 2011), fibrose e finalmente calcificação das cúspides (revisado por Leopold 2012 e Rutkovskiy et al. 2017).

1.4 PRÓTESES VALVARES

A cirurgia de substituição valvar passou a ser utilizada no início dos anos 1960 melhorando drasticamente a vida de pacientes com DVC (Pibarot & Dumesnil 2009). No início, as válvulas mecânicas eram amplamente aplicadas, atualmente,

uma diversidade de modelos está disponível para transplante, nestes estão incluídas as biopróteses e os arcabouços biológicos (homoenxertos e heteroenxertos) (Figura 1.5) (Namiri, Ashtiani, et al. 2017). De acordo com Pibarot e Dumesnil (2009) o substituto valvar ideal deve mimetizar as características das válvulas nativas, apresentando excelente hemodinâmica, alta durabilidade, tromborresistência e excelente implantabilidade. Além disso, a escolha do tipo de prótese a ser colocada no paciente deve incluir uma criteriosa avaliação do médico responsável a respeito das condições como idade, histórico prévio de doenças, bem como a posição da válvula comprometida a fim de minimizar possíveis complicações após a cirurgia (Pibarot & Dumesnil 2009).

Até o momento os modelos prostéticos mecânicos são o tipo mais durável de substituto valvar, entretanto, há várias limitações para o paciente receptor desse material. A principal limitação é o uso de anticoagulantes, necessários para evitar o risco de tromboembolismo e que em contrapartida também aumentam o risco de hemorragia (Cheung et al. 2015; Pibarot & Dumesnil 2009). Além disso, em pacientes pediátricos, essas válvulas apresentam taxas maiores de calcificação e o indivíduo precisa ser operado repetidas vezes ao longo da vida para o redimensionamento da válvula (Masuda et al. 2008).

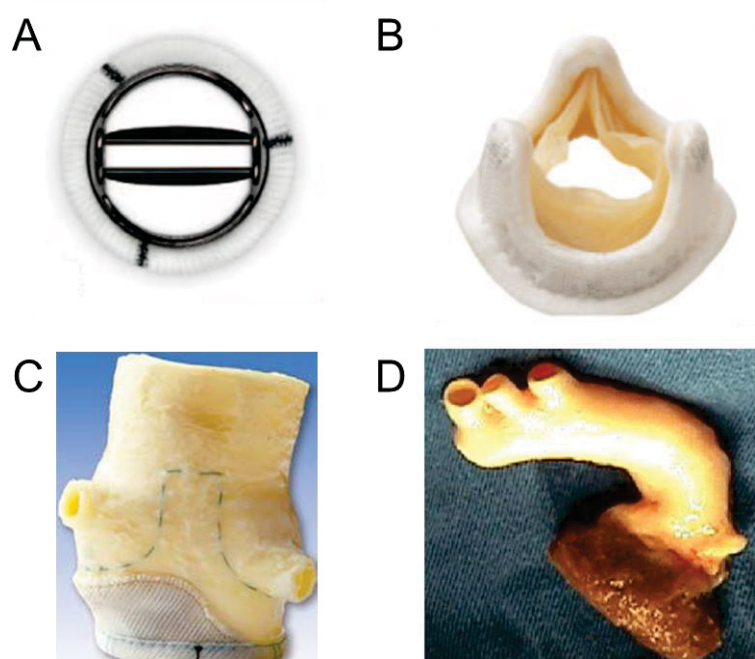


Figura 1.5 Tipos de próteses valvares. (A) Prótese mecânica bicúspide; (B) Bioprótese de pericárdio porcino; (C) Heteroenxerto porcino Medtronic Freestyle® (D) Homoenxerto humano do Núcleo de Enxertos Cardiovasculares da PUCPR. Modificado de Pibarot & Dumensil, 2009.

A fim de superar as limitações encontradas com o uso das próteses mecânicas, os esforços científicos passaram a ser direcionados para o desenvolvimento das biopróteses. Nesse tipo de enxerto são utilizados tecidos de pericárdio porcino ou bovino geralmente fixado com glutaraldeído e posteriormente montado em um estente de suporte metálico ou polimérico (Pibarot & Dumesnil 2009). A fixação com glutaraldeído preserva as fibras de colágeno e reduz a antigenicidade do tecido. Além disso, tais próteses exibem perfis hemodinâmicos de abertura e fechamento mais próximos às válvulas nativas e podem ser implantadas a partir de cirurgias transcatéter minimamente invasivas (Singhal, Luk, & Butany 2013). Entretanto, a durabilidade desses enxertos é considerada reduzida (10-20 anos) já que eles podem degenerar devido ao desenvolvimento de resposta inflamatória e calcificação (Cheung et al. 2015).

Por fim, os arcabouços biológicos são produzidos a partir da dissecação de válvulas cardíacas animais (heteroenxertos) ou humanas (homoenxertos). Essas próteses são projetadas para funcionar sem o estente, mimetizando a anatomia e a hemodinâmica da válvula nativa (Freitas-Ferraz et al. 2019). Assim como as biopróteses, os heteroenxertos passam pelo processo de fixação com glutaraldeído enquanto que os homoenxertos, derivados de válvulas cadavéricas humanas, podem ser transplantados sem esse tratamento (Singhal et al. 2013). Considerando a funcionalidade, os homoenxertos são superiores a qualquer outro substituto valvar, eles apresentam desempenho hemodinâmico fisiológico, não necessitam de nenhuma terapia anticoagulante e são mais resistentes a endocardite (revisado por Lisy et al. 2017). Apesar de todas essas vantagens, as principais limitações para a utilização dessas válvulas referem-se a maior complexidade técnica das operações (O'Brien 1995), restringindo sua aplicação em centros com maior volume de operação, e principalmente ao fato de que a demanda por substitutos valvares para implante excede significativamente o número de doadores humanos. Adicionalmente, as técnicas de obtenção, processamento e estocagem dos homoenxertos são bastante complexas. No Brasil, o Banco de Valvas Cardíacas Humanas do Hospital de Caridade da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba (BVCHSC) é o único em atividade no país (Ferreira et al. 2016).

1.5 VÁLVULAS CARDÍACAS DE ENGENHARIA DE TECIDOS

A necessidade clínica de substitutos valvares eficientes direcionou as investigações científicas para o campo de engenharia de tecidos, uma área que visa solucionar os problemas de falência de órgãos através da substituição desses por réplicas biomiméticas (Hasan et al. 2014). Desde então, além das condições previamente estabelecidas para designar uma prótese valvar ideal, novos requisitos foram estabelecidos, dentre eles: biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência a calcificação e idealmente, a válvula desenvolvida deve ter a capacidade de crescer, remodelar-se e adaptar-se às condições fisiológicas mutáveis do organismo do paciente (Hasan et al. 2016; Namiri, Ashtiani, et al. 2017). Nesse sentido, Cheung, Duan e Butcher (2015), reuniram os critérios cruciais e benéficos para o desenvolvimento de uma válvula cardíaca de engenharia de tecidos (VCET) (Tabela 1-1). Atualmente, para o desenvolvimento e estudo de VECT, são utilizados diferentes arcabouços/*scaffolds*. Esse termo denomina estruturas tridimensionais criadas para substituir o tecido original, que atuam como suporte para o crescimento de células. Os arcabouços desenvolvidos na engenharia de tecidos podem ser divididos em duas categorias principais: polímeros biodegradáveis sintéticos e matrizes naturais (Namiri, Ashtiani, et al. 2017).

Tabela 1-1 Critérios para o desenvolvimento de uma VCET ideal.

Crucial	Benéfico
Não-imunogênico	Formato anatômico
Não-trombogênico	Fenótipos celulares heterogêneos e composição da MEC apropriados
Não-obstrutivo	Crescimento com o paciente
Mecanicamente robusto	Combinação entre durabilidade e facilidade de substituição
Coaptação total	
Fácil infiltração e diferenciação celular	
Biodegradável	

Adaptado de Cheung et al, 2015.

Os polímeros biodegradáveis sintéticos são considerados materiais promissores para a construção de arcabouços que simulam a MEC de válvulas cardíacas nativas (Hirt, Hansen, & Eschenhagen 2014). A principal vantagem desses materiais é que se pode prever com precisão as propriedades mecânicas e químicas, e a taxa de degradação do enxerto produzido (Pérez et al. 2012). Os

materiais mais frequentemente utilizados para estruturar válvulas cardíacas são o poli-ácido glicólico (PGA), poli-ácido láctico (PLA), a policaprolactona (PCL) e o polihidroxidobutirato (P4HB) (Cheung et al. 2015). A cada dia novas técnicas são desenvolvidas para construção de enxertos a partir de polímeros sintéticos, as metodologias mais utilizadas incluem o *electrospinning* (Jana & Lerman 2019) e a impressão 3D (Fallahiarezoudar et al. 2017). Apesar disso, os polímeros sintéticos disponíveis para atuarem como substitutos valvares ainda não são capazes de fornecer moléculas sinalizadoras do microambiente valvar, fatores que ainda impedem a aplicação desses enxertos clinicamente (Namiri, Ashtiani, et al. 2017).

Quanto às matrizes naturais, duas abordagens são utilizadas atualmente. Na primeira, componentes naturais como ácido hialurônico, quitosana, colágeno, alginato, agarose entre outros, são empregados para a produção de arcabouços que suportem a adesão e a proliferação celular (Bakhshandeh et al. 2017). Recentemente, Fu et al. (2017) utilizaram um compósito feito de colágeno e quitosana para o desenvolvimento de um arcabouço de válvula cardíaca. Os resultados obtidos mostraram que o compósito foi citocompatível, já que permitiu a adesão de CTMs. Na segunda abordagem, MECs completas isoladas a partir de um tecido ou órgão inteiro são utilizados para o desenvolvimento de arcabouços através da técnica de descelularização (Guruswamy Damodaran & Vermette 2018).

1.5.1 Descelularização tecidual

A descelularização é o processo de remoção do conteúdo celular de um tecido ou órgão enquanto retém a estrutura e os componentes da sua MEC. Como a MEC é produzida por células nativas de um tecido, ela pode fornecer suporte mecânico e ainda moléculas sinalizadoras específicas daquele local (Guruswamy Damodaran & Vermette 2018). Assim, uma matriz descelularizada de válvula cardíaca pode fornecer informações para a adesão, proliferação e diferenciação de células próprias do microambiente valvar. Essa condição configura uma importante vantagem das matrizes descelularizadas sobre as sintéticas no âmbito da engenharia de tecidos (Namiri, Ashtiani, et al. 2017).

As metodologias para a remoção do conteúdo celular utilizam estratégias químicas, físicas e enzimáticas isoladas ou em combinação para obtenção de matrizes acelulares com atividade biológica. Podem ser utilizados, por exemplo,

agitação, pressão, congelamento-descongelamento, detergentes, soluções hipo/hipertônicas, enzimas proteases e nucleases, quelantes, entre outros métodos para obtenção de um tecido descelularizado (Crapo, Gilbert, & Badylak 2011; Naso & Gandaglia 2018). As técnicas mencionadas possuem diferentes vantagens e limitações, assim como a eficácia de cada uma está sujeita a características do tecido tratado, como: celularidade, densidade, conteúdo lipídico e espessura (Crapo et al. 2011). Em todos os casos, o objetivo final do processo de descelularização valvar é obter uma matriz imunologicamente inerte, atóxica, biocompatível e com propriedades mecânicas preservadas. Na tentativa de determinar quantitativamente o que é um tecido/órgão descelularizado, Crapo e colaboradores (2011) estabeleceram os seguintes critérios: (1) até 50 ng de dsDNA/mg de tecido seco; (2) ausência de material nuclear visível nos cortes histológicos corados com H&E e DAPI; (3) fragmentos de DNA inferiores a 200 pb.

Homoenxertos humanos descelularizados já são utilizados com sucesso clinicamente. O primeiro ensaio clínico com homoenxertos valvares descelularizados foi reportado por Elkins et al. no ano 2000 (apud de Masuda et al. 2008). Os enxertos foram tratados com a tecnologia Synergraft® (Cryolife – EUA) e transplantados em 32 pacientes que evoluíram satisfatoriamente e apresentaram nenhuma ou pouca elevação de antígenos reativos (PRA). Além das válvulas humanas descelularizadas do modelo Synergraft que são comercializadas nos EUA e na Europa, estão disponíveis, apenas no mercado europeu, as válvulas descelularizadas AutoTissue GmbH's Matrix P plus N™ e a CardioPure dCELL®. Sendo que esta última foi desenvolvida a partir de tecnologia padronizada pelo Núcleo de Enxertos Cardiovasculares (NEC) do Laboratório de Engenharia de Tecidos e Transplante Celular da PUCPR e consiste na mesma técnica aplicada para o preparo de homoenxertos distribuídos no Brasil pelo BVCHSC (Costa et al. 2005). Após a descelularização, os homoenxertos humanos podem ser diretamente implantados nos pacientes para que sejam recelularizados *in vivo* com células do próprio hospedeiro (Costa et al. 2007b) ou o enxerto produzido poderá ser previamente repovoado com células do hospedeiro *in vitro*, antes do implante (Dohmen et al. 2007), entretanto, não há dados confirmando como as duas formas de recelularização afetam o desempenho das próteses.

1.5.2 Xenotransplantes

Dada a escassez de doadores de órgãos ao redor do mundo, muitas iniciativas científicas foram direcionadas ao desenvolvimento de tecidos que possam ser transplantados entre espécies diferentes (xenotransplantes). No caso das válvulas cardíacas, um xenoenxerto valvar oferece uma série de vantagens, dentre elas está o fornecimento de um número ilimitado de tecidos de tamanhos diferentes (Manji, Lee, & Cooper 2015). Considerando a anatomia, os porcos parecem ser fontes interessantes de xenoenxertos. O coração porcino – incluindo as válvulas cardíacas - é semelhante ao coração humano e fisiologicamente o débito cardíaco e o volume sistólico, principais indicadores da função cardíaca, também são comparáveis entre humanos e suínos (Ibrahim et al. 2006). Entretanto, a principal barreira para a utilização dos tecidos porcinos em humanos é a presença de antígenos que podem levar a complicações pós-cirúrgicas que incluem a rejeição tecidual (Meier et al. 2018).

O carboidrato galactose-alfa-1,3-galactose (alfa-Gal) é um componente expresso constitutivamente nos tecidos de mamíferos com exceção dos humanos e primatas superiores (Naso & Gandaglia 2018). Essa molécula é apontada como um dos principais causadores de rejeição hiperaguda causada por xenotransplantes. Tal condição configura uma resposta severa ao tecido xenogênico que pode ocorrer de alguns minutos a poucas horas após o transplante e geralmente leva a destruição do enxerto em menos de 24 horas (Aristizabal et al. 2017). Adicionalmente, alguns autores sugerem que o DNA remanescente após a descclularização também pode desencadear uma resposta imune inflamatória (Zheng et al. 2005). Entretanto, considera-se improvável que fragmentos de DNA menores que 300 pares de bases possam induzir essa resposta (Nagata, Hanayama, & Kawane 2010). Desse modo, um passo essencial para a aplicação segura de xenoenxertos porcinos descclularizados em humanos é a prévia negativação do alfa-Gal nos arcabouços celulares.

1.5.3 Recelularização de tecidos descclularizados

Estudos demonstraram que a recelularização de válvulas cardíacas descclularizadas pode reduzir a resposta imune induzida pelos tecidos (Schmidt &

Hoerstrup 2005), diminuir o risco de trombose e infecção (Cebotari et al. 2002), e ainda evitar a calcificação do enxerto transplantado (Cebotari et al. 2002; Schoen and Levy 2005). Entretanto, sabe-se que a repopulação de enxertos descelularizados é limitada devido à alta compactação das moléculas da matriz valvar (apud de Namiri et al. 2017). Além disso, o próprio processo de descelularização pode causar danos à MEC dificultando a adesão celular (Liao, Joyce, & Sacks 2008). Desse modo, a recelularização de arcabouços permanece um desafio para engenharia de tecidos. Uma série de soluções para esse problema foram propostas ao longo dos últimos anos (Namiri, Ashtiani, et al. 2017). Dentre as possíveis abordagens destacamos: a seleção do tipo celular adequado para repopulação valvar e a utilização de moléculas bioativas capazes de facilitar a adesão, migração e proliferação das células nesses tecidos.

1.5.4 Tipos celulares para recelularização valvar *in vitro*

De acordo com Jana e colaboradores (2016), o sucesso das VCET é, em grande parte, influenciado pela fonte celular utilizada. Nesse aspecto, células xenogênicas (de outros animais), autólogas (do próprio paciente) e alogênicas (de indivíduos da mesma espécie) podem ser utilizadas para recelularização do substituto valvar. Dentro da engenharia de tecidos diferentes tipos celulares já foram utilizados na recelularização de válvulas descelularizadas, dentre eles: fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas, células-tronco pluripotente induzidas (iPS, do inglês *induced pluripotent stem cells*), entre outras (revisado por Jana, Tranquillo, & Lerman 2016). No presente trabalho destacaremos o uso das CTMs e das células das VIC e VEC na recelularização de VCET.

1.5.4.1 Células-tronco mesenquimais

Atualmente, grande parte dos estudos em medicina regenerativa está concentrada no potencial das CTMs em VCET. CTMs são um conjunto heterogêneo de células aderentes ao plástico, com capacidade de autorrenovação e diferenciação para tecidos da linhagem mesodérmica *in vitro*. Essas células apresentam propriedades imunomoduladoras, como anti-inflamatória e imunossupressiva e desempenham suas atividades principalmente através da sinalização parácrina (Li & Hua 2017). Em condições de cultivo, as CTMs devem

expressar os marcadores CD73, CD90 e CD105 e não apresentarem expressão dos marcadores CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19 e HLA-DR (Dominici et al. 2006). As principais vantagens da utilização das CTMs na engenharia de tecidos são: a possibilidade de serem isoladas de fonte autóloga (próprio paciente) a partir de tecidos como; medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical, e a sua capacidade de diferenciação. De fato, um estudo prévio envolvendo VCET demonstrou que CTMs isoladas de cordão umbilical foram capazes de se diferenciar em células endoteliais-*like* e reendotelizar cúspides de valva cardíaca descelularizada (Lanuti et al. 2015). Além disso, CTMs tem a capacidade de inibir a resposta imune em níveis diferentes, facilitando a sua utilização em transplantes alogênicos (Podestà, Remuzzi, & Casiraghi 2019).

1.5.4.2 VIC e VEC

De acordo com VeDepo e colaboradores (2017), um dos principais desafios para o desenvolvimento de uma VCET é a recelularização com VIC e VEC para criar uma população fisiologicamente apropriada. Entretanto, poucos estudos foram realizados para determinar o potencial dessas células na regeneração de enxertos valvares (Jana et al. 2016). Em modelos animais, observa-se que válvulas descelularizadas são parcialmente re-endotelizadas após o transplante, aparentemente as células que passam a revestir o enxerto são derivadas de progenitores endoteliais circulantes (Quinn et al. 2012). Entretanto, como o repovoamento de camadas mais internas das cúspides permanece um desafio, não está claro se essas células endoteliais têm a capacidade de migrar para o interior da cúspide e diferenciar-se em VIC, tal como ocorre durante a embriogênese. De qualquer forma, a recelularização de VCET *in vitro* com VIC e VEC pode prover importantes respostas a respeito da integridade da MEC após a descelularização e ainda fornecer pistas do comportamento do enxerto *in vivo*, uma vez que VIC podem diferenciar-se em obVIC em situações de estresse, podendo levar à calcificação do enxerto.

1.5.5 Utilização de moléculas bioativas em VCET

Considerando a reiterada limitação na recelularização de válvulas descelularizadas, uma das estratégias atuais é a utilização de moléculas bioativas

que sejam capazes de auxiliar a adesão, migração e proliferação celular dentro do enxerto. Em diferentes arcabouços de engenharia de tecidos já foram verificados, por exemplo, os efeitos da imobilização de fatores de crescimentos como, FGF e VEGF (Odedra et al. 2011), assim como os efeitos de outras moléculas, como colágeno (Gautam et al. 2014), angiopoitina-1 (Chiu & Radisic 2010), fator derivado do estroma-1 α (SDF-1 α) (Namiri, Kazemi Ashtiani, et al. 2017) e ainda meio condicionado de células A549 (linhagem epitelial) (Zhao et al. 2016). Na maior parte dos casos após a adição das moléculas bioativas foram observados efeitos positivos na recelularização tecidual. Entretanto, a utilização clínica dessas moléculas ainda é considerada controversa já que não há dados suficientes que verifiquem possíveis efeitos negativos. Nesse sentido, novos estudos são necessários para determinar a aplicação segura dessas substâncias (Namiri, Ashtiani, et al. 2017).

1.5.6 Vesículas extracelulares

Vesículas extracelulares (VEs) são um conjunto de partículas delimitadas por membrana lipídica e liberadas por diversos tipos celulares (El Andaloussi et al. 2013). Inicialmente, acreditava-se que essas partículas eram debris celulares desprovidos de significância biológica (Wolf 1967), entretanto, atualmente sabe-se que as VEs abrigam um conteúdo molecular variado e desse modo podem desempenhar papéis essenciais na comunicação celular (Abels and Breakefield 2016). De fato, já foram encontrados diversos tipos de moléculas em VEs isoladas de fontes distintas, tais como carboidratos, proteínas (ex: tetraspaninas, proteínas associadas a *lipid rafts*), lipídeos (ex: colesterol, esfingomielina, hexosilceramida) e uma ampla variedade de ácidos nucleicos (DNA, mRNA e RNA não-codificante) (Raposo & Stoorvogel 2013) (Figura 1.6).

Desde 2012 a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (*International Society for Extracellular Vesicles* – ISEV) estabeleceu três grupos principais nos quais as VEs podem ser classificadas considerando-se a sua biogênese e tamanho, são eles: microvesículas, exossomos e corpos apoptóticos. De acordo com essa classificação, microvesículas são partículas de tamanho entre 50-1000 nm originadas a partir de brotamento e fissão da membrana plasmática das células (El Andaloussi et al. 2013). Uma combinação de fatores pode resultar na formação e liberação de microvesículas, tais como redistribuição de fosfolipídios e

contração da maquinaria actina-miosina. Além disso, sabe-se que esses fatores são controlados por níveis de cálcio intracelular, de modo que o aumento de íons Ca^{2+} por influxo a partir do meio extracelular e mobilização de cálcio de fontes intracelulares pode levar ao aumento de secreção de VEs (Turturici et al. 2014).

Já os exossomos, são partículas de diâmetro entre 40-120 nm formadas a partir do brotamento interno da membrana do endossomo. Esses brotamentos originam pequenas vesículas que se desprendem para dentro do lúmen endossomal formando os corpos multivesiculares (MVBs, do inglês *multivesicular bodies*). Após a sua formação os MVBs podem se fundir aos lisossomos levando a degradação dessas pequenas vesículas (via lisossomal) ou seguir para via secretora, na qual os MVBs se fundem com a membrana plasmática e liberam as vesículas que passam a ser chamadas de exossomos (Ibrahim & Marbán 2016). Por fim, os corpos apoptóticos são vesículas de tamanho muito variado (500-2000 nm) formadas durante o estágio tardio da apoptose (Elmore 2007) e, por essa razão, contém material nuclear, organelas e conteúdo citosólico (El Andaloussi et al. 2013).

Uma vez liberadas das células de origem, as VEs podem entregar um conjunto de informações moleculares para as células alvo. Nesse sentido, é bem estabelecido que essa comunicação pode acontecer através da fusão da membrana vesicular com a membrana plasmática da célula receptora, da internalização da vesícula ou ainda, da direta ligação de moléculas presentes na superfície das VEs nos receptores da membrana celular (El Andaloussi et al. 2013) (Figura 1.6).

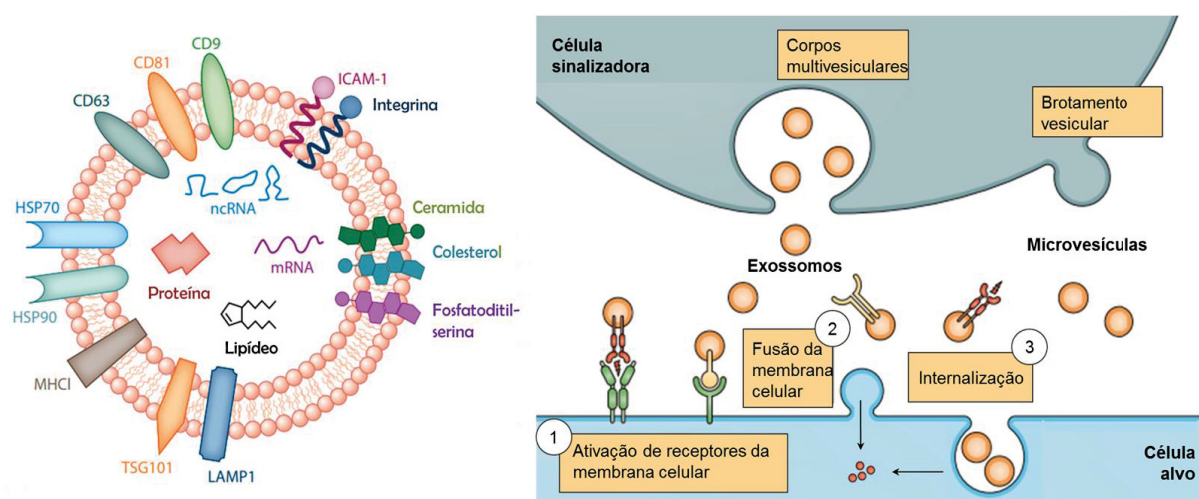


Figura 1.6. Conteúdo vesicular e formas de interação entre as vesículas extracelulares e as células alvo. (A) VEs podem abrigar uma série de moléculas bioativas como: proteínas, ácidos nucleicos (ncRNA e mRNA) e lipídeos. Externamente, moléculas de adesão (ICAM, integrinas), *heat shock proteins* (HSP70, HSP90), e, no caso de exossomos, marcadores da via endossomal (LAMP1, TSG101), assim como tetraspaninas (CD9, CD63 e CD81) são observados. Além dessas, outras moléculas presentes na membrana da célula de origem podem estar presentes nas VEs (MHC1). (B) Após a sua liberação da célula sinalizadora, exossomos e microvesículas podem interagir com a célula alvo através da (1) ativação de receptores de membrana celular; (2) da fusão das membranas vesicular e celular e (3) da internalização da VEs. FONTE: Modificado de Ibrahim e Marbán (2017) e El Andaloussi et al. (2013).

1.5.7 Vesículas extracelulares na engenharia de tecidos

Historicamente, estudos conduzidos na área de engenharia de tecidos frequentemente associam diferentes materiais a tipos celulares com potencial terapêutico (Lamichhane et al. 2015). Entretanto, as abordagens utilizando células apresentam algumas limitações, que incluem custo excessivo, acesso restrito às fontes de isolamento celular e aprovação regulatória (Bakhshandeh et al. 2017). Na tentativa de preservar o efeito terapêutico e solucionar as limitações apresentadas pelas estratégias celulares, as pesquisas relacionadas à regeneração tecidual passaram a se concentrar na utilização de estratégias livre de células (*cell-free strategies*). Nesse sentido, VEs derivadas de CTMs são extensivamente estudadas uma vez que muitos dos efeitos positivos obtidos com CTMs podem ser reproduzidos utilizando apenas VEs isoladas, com as vantagens de que as VEs não apresentam os fatores de risco conhecidos para células-tronco como potencial tumorigênico, além de serem facilmente estocadas e utilizadas em regime de dosagem conhecido (Allan et al. 2019; Bjørge et al. 2018). Recentemente, um estudo demonstrou que arcabouços ósseos funcionalizados com exossomos

derivados de CTMs foram capazes de promover vascularização e aumentar a regeneração óssea quando implantados em camundongos (Xie et al. 2017).

Além de VEs derivadas de CTMs, muitos outros tipos celulares podem ser utilizados como fonte dessas partículas. VEs derivadas de células cardíacas, por exemplo, vem sendo apontadas como importantes componentes cardioprotetores (Wendt et al. 2018). Em experimentos conduzidos em animais, já foi demonstrado que VEs derivadas de células progenitoras cardíacas (CPCs) são capazes de reduzir o tamanho da cicatriz e melhorar a função ventricular de ratos submetidos à oclusão da coronária (Barile et al. 2014). Apesar disso, o potencial das vesículas cardíacas na regeneração tecidual permanece pouco explorado.

1.6 JUSTIFICATIVA

No contexto da medicina regenerativa, a descelularização de enxertos valvares tem potencial para fornecer um substituto ideal do ponto de vista anatômico e fisiológico. Se aplicada eficientemente, a descelularização de tecidos animais pode se tornar uma alternativa à escassez de tecidos humanos para transplante. Para isso, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas de descelularização capazes de equilibrar o balanço entre a remoção do conteúdo celular e a manutenção da estrutura e das moléculas da matriz tecidual, gerando tecidos não-imunogênicos e que preservem a capacidade de crescimento e remodelamento. Adicionalmente, avaliar diferentes tipos celulares e moléculas bioativas nas matrizes descelularizadas, pode fornecer informações importantes a respeito do comportamento *in vivo* desses enxertos e auxiliar na construção de próteses de melhor desempenho e durabilidade.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Comparar a eficiência de dois protocolos de descélularização em válvulas cardíacas pulmonares porcinas e avaliar a biocompatibilidade *in vitro* desses tecidos com células humanas e vesículas extracelulares.

1.7.2 Objetivos Específicos

- a) Descélularizar válvulas cardíacas pulmonares porcinas utilizando um protocolo de etapa única e um protocolo combinado;
- b) Avaliar a eficiência dos protocolos de descélularização na remoção do conteúdo celular e do DNA dos tecidos;
- c) Caracterizar a MEC das válvulas antes e depois dos processos de descélularização;
- d) Avaliar a citotoxicidade e a resposta imune celular das válvulas produzidas;
- e) Verificar a capacidade de células humanas em aderir, proliferar, migrar a formar nova matriz nos tecidos descélularizados;
- f) Isolar e caracterizar vesículas extracelulares derivadas de explantes cardíacos humanos;
- g) Avaliar os efeitos das vesículas extracelulares sobre a proliferação, adesão, migração e angiogênese de células humanas;
- h) Determinar a influência das vesículas extracelulares derivadas de explante cardíaco sobre a recélularização de cúspides valvares.

2 CAPÍTULO I

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Aspectos éticos

As válvulas cardíacas utilizadas nesse trabalho foram obtidas de porcos da espécie *Sus domesticus* abatidos em frigorífico com regulamentação sanitária e ambiental (FrigKeller LTDA, PR, Brazil). De acordo com a Resolução Normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), cadáveres ou parte deles oriundos das atividades de matadouros, frigoríficos, abatedouros ou produtores rurais para consumo podem ser utilizadas para fins de pesquisa sem necessidade de parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Além disso, o isolamento de células e vesículas cardíacas humanas foi realizado a partir de fragmentos de corações de 8 doadores diferentes. Os fragmentos foram obtidos de material excedente da dissecação de válvulas cardíacas realizado pelo Banco de Tecidos da PUCPR (Paraná, Brasil). Após o processamento este material é descartado, e pode ser utilizado de acordo com a legislação vigente - Portaria nº 2048, Seção XI de transplantes, Cláusula 478 - que discorre sobre a utilização de tecidos, órgãos ou partes do corpo humano quando esgotadas todas as possibilidades de uso em transplantes. Os indivíduos doadores de sangue periférico assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B). Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética da PUCPR, parecer número 1.455.773.

2.1.2 Coleta e dissecação de válvulas pulmonares porcinas

Para a dissecação das válvulas cardíacas, 80 corações porcinos de fêmeas e machos saudáveis com idades entre 180-210 dias e peso entre 80-95 kg foram obtidos de abatedouro local (FrigKeller LTDA, PR, Brasil). Após a remoção, os corações foram repetidamente lavados com solução salina isotônica, para retirada de sangue e coágulos e em seguida transportados até o laboratório em frascos contendo solução salina isotônica com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) a 4°C. No laboratório, a válvula pulmonar foi dissecada, mantendo-se uma pequena porção do miocárdio e aproximadamente 4-5 cm de conduto. A túnica

adventícia e o tecido gorduroso periadventicial dos condutos foram parcialmente removidos e em seguida as válvulas foram colocadas em solução de tampão fosfato salino (PBS) contendo 10% de penicilina, 2% de anfotericina e mantidas à 4°C por pelo menos 12 horas para descontaminação.

2.1.3 Descelularização das válvulas cardíacas

Após o período de descontaminação estabelecido, as amostras foram separadas em 3 grupos distintos: (1) válvula pulmonar não descelularizada/nativa (VPN), (2) válvula pulmonar descelularizada com SDS (VPD-S) e (3) válvula pulmonar descelularizadas com SDS e Benzonase (VPD-B). Para a descelularização, tecidos dos grupos VPD-S e VPD-B foram separados individualmente em frascos contendo solução de SDS 0,1% e EDTA 0,02% e mantidos em temperatura ambiente durante 24 horas. O SDS solubiliza as membranas citoplasmática e nuclear, e desfaz as ligações não covalentes das proteínas enquanto o EDTA facilita o processo de dissociação das células da MEC (Naso & Gandaglia 2018). Em seguida, apenas as válvulas do grupo VPD-B foram colocadas em solução salina hipertônica (10 mM de TrisHCl e 5 M de NaCl pH 8) durante 4 horas, para intensificar a lise celular e favorecer a dissociação das proteínas do DNA (Cox & Emili 2006). Posteriormente, as válvulas foram deixadas em solução (10 mM de TrisHCl, 5 mM de MgCl₂) contendo 20 U/ml de Benzonase, (Sigma-Aldrich), uma endonuclease capaz de fragmentar o DNA através da clivagem de nucleotídeos no meio da sequência (Crapo et al. 2011), a 37°C durante 20 horas. Após essa etapa, os tecidos do grupo VPD-B foram lavados em solução de 10 mM de TrisHCl por mais 8 horas. Ao término da descelularização os tecidos dos dois grupos foram colocados em etanol 70% durante 24 horas para favorecer a precipitação de resíduos de fosfolipídeos e SDS. Em todas as etapas, as válvulas foram deixadas em agitação constante de 185 rpm com volume de solução de descelularização de 200 mL/válvula. Finalmente, para assegurar a remoção completa dos componentes usados na descelularização, as válvulas foram lavadas em solução de NaCl 0,9% durante 10 dias (uma troca de solução por dia) antes da realização dos experimentos. Enquanto os processos de descelularização dos grupos VPD-S e VPD-B eram realizados as válvulas do grupo VPN permaneceram armazenadas a 4°C em PBS estéril.

2.1.4 Quantificação do DNA remanescente nos tecidos após a descclularização

Com o objetivo de comparar a eficiência de descclularização dos protocolos utilizados, amostras de tecido dos três grupos foram submetidas a processamento histológico e extração de DNA. Para a realização da histologia, as amostras de válvulas cardíacas foram fixadas em formalina 10%, emblocadas em parafina e levadas ao micrótopo para a realização de cortes na espessura de 4 µm. Em seguida, os cortes histológicos foram desparafinizados e corados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ou H&E (Hematoxilina-Eosina) para verificação da presença de núcleos celulares íntegros.

Para análise do DNA remanescente nos tecidos após a descclularização, foi utilizado protocolo descrito por Liu e Harada (2013). Inicialmente, as cúspides, uma porção do conduto e uma porção do músculo valvar foram removidas e liofilizadas até um peso constante. Em seguida, cerca de 10 mg de cada tecido foram distribuídos em tubos contendo 500 µl de tampão de extração (10 % de SDS, 1 M de TrisHCl, 5 M de NaCl e 0,5 M de EDTA) e 20 µl de proteinase K (20 mg/ml, Invitrogen). Para garantir a eficiência do processo de extração, cada amostra foi preparada em triplicata técnica, sendo que em uma das triplicatas foram adicionados 8000 ng de DNA *spike* de timo de bezerro (Sigma-Aldrich), com a adição de uma concentração conhecida de DNA na amostra é possível estimar a recuperação do DNA ao final da extração. Essa preparação, foi incubada a 60°C e 800 rpm *overnight*. Uma vez verificada a digestão total do tecido, foram adicionados às amostras 167 µl de solução de acetato de potássio (5 M de acetato de potássio, 11,5% ácido acético glacial, pH 7,5) seguido de incubação a -20°C por 10 min. Posteriormente, os tecidos foram centrifugados a 11200 xg, 4°C por 15 min, o sobrenadante recolhido foi transferido para novos tubos aos quais foram adicionados 400 µl de Isopropanol para precipitação do DNA. Após nova centrifugação realizada nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 70 µl de água ultra-pura para a quantificação do DNA extraído através de leituras em espectrofotômetro (NanoDrop - ND-1000 – comprimento de onda na faixa de 260 nm). Para confirmar a confiabilidade do protocolo de extração de DNA, as amostras com DNA *spike* adicionado devem apresentar de 70 a 120% de recuperação ao final do processo. A recuperação acima de 100% é aceita uma vez que o DNA *spike* adicionado não está necessariamente nas mesmas condições

do DNA da amostra, podendo implicar em melhor detecção ocasionando avaliações excessivamente otimistas de recuperação.

Para complementar os dados obtidos a partir da quantificação do DNA, uma amostra de DNA extraído da cúspide, conduto e músculo de cada grupo foram adicionadas a gel de agarose 1% e submetidas à eletroforese. Para determinação do tamanho dos fragmentos foi utilizado marcador 123 pb.

2.1.5 Avaliação histológica e de imunofluorescência dos tecidos descelularizados

Para verificar possíveis alterações na MEC valvar decorrentes dos protocolos de descelularização, cortes histológicos (4 µm) foram desparafinizados, lavados em PBS por três vezes e submetidos à reativação antigênica térmica. Para o procedimento de reativação, as lâminas contendo os cortes de tecido foram acondicionadas em frascos com 30 mL de solução de citrato de sódio (10 mM de citrato de sódio e 0,05% Tween 20, pH 6,0) e levadas ao micro-ondas até a fervura. Em seguida, as lâminas foram deixadas para resfriar por aproximadamente 1 hora e posteriormente foram lavadas em PBS para então serem bloqueadas com PBS 1% de BSA por 60 min. Após esse período, foram incubados os anticorpos primários anti-colágeno I (1:200, Abcam), anti-elastina (1:200, Abcam) e anti-vimentina (1:200, BD Biosciences) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a novas lavagens com PBS e em seguida foram incubados os anticorpos secundários conjugados a Alexa Flúor 546 (1:600) por 1 hora. Finalmente, seguiu-se a incubação com DAPI por 10 min, lavagem com PBS e fechamento da lâmina com meio de montagem ProLong™ Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher).

Com os cortes histológicos obtidos a partir dos mesmos blocos de parafina, foi realizada a coloração com Ácido periódico de Schiff (PAS) e Alcian Blue para verificação do conteúdo de GAG dos tecidos. Adicionalmente, para detecção do antígeno alfa-Gal as lâminas foram desparafinizadas, bloqueadas com solução de PBS 1% de BSA por 1 hora e diretamente incubadas com Isolectina B4 de *Bandeiraea simplicifolia* conjugada a FITC (BSI-B4; *Griffonia simplicifolia*, Sigma-Aldrich), sem prévia reativação antigênica. Como controle positivo, foram realizadas marcações com isolectina B4 em cortes de intestino porcino. As preparações histológicas foram analisadas qualitativamente em microscópio invertido DMI6000B

(Leyca Microsystems, Wetzlar, Germany) associado a software de deconvolução AF6000 (Leyca Microsystems, Wetzlar, Germany), foram observadas as regiões da cúspide, conduto e músculo.

2.1.6 Avaliação ultraestrutural das válvulas por microscopia eletrônica de varredura

Para a observação de possíveis alterações estruturais causadas pela remoção das células do tecido valvar, fragmentos de aproximadamente 4 mm² da cúspide e do conduto dos três grupos de estudo foram fixados em 2,5 % de glutaraldeído e pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio, ambos preparados em tampão 0,1 M de cacodilato de sódio (pH 7,2). Em seguida, as preparações foram desidratadas utilizando soluções crescentes de etanol e submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico, utilizando CO₂. Posteriormente, os tecidos foram montados em suportes metálicos, recobertos com ouro coloidal e analisados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6010PLUS-LA).

2.1.7 Avaliação da citotoxicidade das válvulas descelularizadas

A citotoxicidade das válvulas pulmonares foi avaliada através de dois métodos: teste de contato direto e teste de extrato, ambos recomendados pela ISO 10993/5. Esses testes foram realizados com células Balb/c 3T3 do clone A31 (Banco de células do Rio de Janeiro – RJ, Brasil), que consiste em uma linhagem de fibroblastos murinos utilizada como referência para testes de citotoxicidade *in vitro*.

Para o ensaio de contato direto, fragmentos de conduto (3-4 mm²) de todos os grupos foram deixados em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, a 4°C por 24 horas. Em seguida, os fragmentos valvares foram aderidos ao fundo de uma placa de 6 poços e posteriormente, 2,2x10⁵ células BALB/c 3T3 foram depositadas em cada poço para serem cultivadas por 72 horas a 37°C, 5% CO₂. Ao término desse período as células presentes na região periférica dos tecidos foram observadas em microscópio de contraste de fase e avaliadas utilizando como referência a classificação morfológica qualitativa proposta pela ISO 10993/5. Nesse experimento células BALB/c 3T3 cultivadas na ausência de tecidos e na presença de 100 ng/µl de SDS foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Esses

ensaios foram realizados em triplicatas técnicas para cada uma das três réplicas biológicas.

Para a realização do segundo teste de citotoxicidade, foram preparados extratos a partir do conduto valvar de todos os grupos. Para isso, 1 mg de tecido liofilizado foi colocado em 1 ml de meio DMEM basal (veículo de extração) e incubados a 37°C por 72 horas. Neste ensaio também foram utilizadas células Balb/c 3T3 clone A31, as quais foram plaqueadas nos 60 poços internos de uma placa de 96 poços (JetBiofil) na densidade de $2,5 \times 10^3$ células/poço ressuspensas em 100 µl/poço de meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 4mM de L-glutamina e na ausência de antibióticos. Após o plaqueamento, as placas foram mantidas em incubadora a 37°C por 24 h. Após esse período, os extratos previamente preparados foram centrifugados a 500 rpm e o sobrenadante foi submetido a oito diluições seriadas com fator de diluição logarítmico 1:2,15, abrangendo no final as concentrações de 500, 232,5, 108,1, 50,3, 23,4, 10,8, 5 e 2,3 µg/mL em meio DMEM isento de SFB e suplementado com 4 mM de L-glutamina e de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

Em cada placa, foi testado apenas um lote de extrato, com cada coluna correspondendo a uma condição testada. As colunas 1 e 12, assim como as linhas A e H, que não continham células, foram utilizadas como branco do experimento. As colunas 2 e 11 foram mantidas como controle negativo (sem tratamento). As colunas de 3 a 10 continham as 8 diferentes concentrações testadas dos extratos. Além disso, para cada experimento uma placa com o controle positivo (SDS 100 µg/µl) foi lançada. Após a adição dos tratamentos, as culturas foram mantidas em incubadora por 48 horas e em seguida coradas com 25 mg/mL de vermelho neutro (Sigma-Aldrich) - corante que se integra nos lisossomos das células viáveis. Em seguida a densidade óptica das amostras foi medida em 540 nm em um leitor Multi-Mode Synergy H1 (Biotek), esses valores foram convertidos em viabilidade em relação ao controle negativo para o cálculo da taxa relativa de crescimento (TCR). $TCR (\%) = (Viabilidade \text{ grupo testado} / Viabilidade \text{ controle negativo}) \times 100$. Se o valor de TCR for menor do que 70%, a amostra deve ser considerada como causadora de citotoxicidade.

2.1.8 Avaliação da resposta imune celular de PBMCs aos tecidos descelularizados

Para essa etapa de trabalho, fragmentos íntegros de conduto, bem como extratos dessa porção das válvulas dos três grupos foram co-cultivadas com células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*). Inicialmente, amostras de sangue periférico foram coletadas de três doadores adultos saudáveis com média de idade de $24,33 \pm 0,66$ anos. Após a coleta, as amostras foram diluídas em PBS estéril e purificadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (densidade 1.077 g/l, LONZA), centrifugadas por 20 min a 1400 rpm. Em seguida, a interface contendo as células mononucleares foi transferida para um novo tubo e submetida à lavagem com PBS e nova centrifugação por 10 min a 1000 rpm. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 5 mL de tampão de lise de hemácias (160 mM de NH_4Cl , 9 mM de NaHCO_3 e 1 mM de EDTA) e mantidas em gelo por 5 min. Após esse período, as células foram submetidas à nova lavagem com PBS e centrifugação a 700 rpm por 15 min. O pellet celular foi ressuspensado em PBS para determinação da concentração celular.

Em seguida, foi realizada a marcação das células com CFSE (do inglês, *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* – Thermo Fischer), essa molécula difunde-se para dentro da célula e emite fluorescência cuja intensidade diminui a cada ciclo celular. Para isso, cerca de 2 mM de CFSE foram adicionados ao tubo contendo 12×10^6 células, essa preparação foi incubada à 37°C por 10 min protegida da luz. Em seguida, a incorporação do marcador foi interrompida a partir da adição de 5 % de SFB aos tubos e incubação por 5 min no gelo, seguida de lavagem com PBS e centrifugação a 2000 rpm por 10 min. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio DMEM suplementado (10% de SFB, 2 mM de L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e distribuídas na densidade de 4×10^5 células/poço em uma placa de 96 poços. A placa havia sido previamente preenchida com fragmentos de 3-4 mm² de conduto valvar ou extrato de conduto preparado para a concentração final de 232,5 µg/mL. Os cultivos de PBMC e válvula foram mantidos por 5 dias em estufa. Ao término desse período, as células foram recuperadas, transferidas para novos poços, para então serem fixadas em PFA 4% e levadas ao citômetro de fluxo (FACSCanto II flowcytometer - BD Biosciences). A análise da proliferação celular induzida pelos tratamentos foi realizada pela

avaliação da população correspondente aos linfócitos utilizando o software FlowJo versão 10.0.8r1 o qual calcula o decaimento da fluorescência do CFSE nas células.

Esses experimentos foram conduzidos em duplicata técnica para cada uma das três réplicas biológicas de amostras porcinas testadas. Como controles foram utilizadas PBMC cultivadas em DMEM suplementado (controle negativo) e PBMC expostas a 2 µl de Fitohemaglutinina (PHA, do inglês *Phytohemagglutinin-L*) que induz a proliferação policlonal (controle positivo).

2.1.9 Isolamento de células intersticiais de válvula cardíaca

Cúspides da válvula mitral de um doador cadáver (feminino, 56 anos – doador A) foram recolhidas pelo Banco de Tecidos da PUCPR e mantidas à 4°C em meio RPMI contendo 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, e 100 µg/mL estreptomicina para serem processadas em até no máximo 48 horas após a coleta.

Para o isolamento das VIC, tais cúspides foram dissociadas em fragmentos de aproximadamente 1 mm³, transferidos para tubos estéreis e lavados com solução salina balanceada (BSS) para remoção de restos celulares e sangue. Em seguida, os fragmentos foram distribuídos homogeneamente em frascos de cultura de 25 cm² previamente recobertos com filme de colágeno tipo I (Sigma-Aldrich). Logo após, foram adicionados de 5 mL de meio de cultivo à garrafa, pipetados do lado oposto ao dos explantes. A fim de facilitar à adesão dos tecidos a superfície de cultura, os frascos foram mantidos com o lado dos explantes voltado para cima por 60 min em incubadora (37°C em atmosfera de 5% de CO₂), ao término desse período a garrafa foi cuidadosamente virada para que o meio cobrisse os explantes. Para o cultivo dos explantes, utilizou-se o meio de cultura Dulbecco's Mega Cell® (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SFB), 2 mM de L-Glutamina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA), 5 ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-b), 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 1% de solução de aminoácidos não-essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). Após a migração, as células foram repicadas e a suspensão celular foi filtrada em filtro *cell strainer* com membrana de nylon com poros de 40 µm para remoção dos explantes e novo plaqueamento.

2.1.10 Caracterização de células intersticiais de válvula cardíaca

Para a caracterização imunofenotípica, as células cultivadas nas passagens 2 e 7, foram lavadas com solução salina balanceada sem cálcio e magnésio (BSS-CMF) e incubadas com solução de 0,025% de tripsina (Sigma-Aldrich) e 0,02% de EDTA (Merck) por um período de 4 minutos a 37° C. Assim que as células se desprenderam da superfície de cultura, a ação da enzima foi inibida através da adição de Mega Cell suplementado com SFB e a suspensão celular foi contada em câmara de Neubauer ao microscópio de luz, com o auxílio do corante de viabilidade celular azul de trypan (0,4%) (Sigma-Aldrich). Em seguida, as células foram incubadas com solução de PBS 1% de BSA por 60 min e posteriormente marcadas, pelo mesmo período de tempo, com anticorpos contra as seguintes proteínas humanas: CD90 (1:20), CD105, CD73, CD31 (1:50), (eBioscience), DDR-2 e alfa-SMA (1:50, Abcam). Em seguida as células foram fixadas em PFA 4% e lavadas em PBS. Foram utilizados anticorpos isotípicos de IgG1 para cada fluorocromo como controles (BD Biosciences). Os dados foram adquiridos com um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e analisados pelo software FlowJo versão 10.0.8r1.

Para verificar se as células isoladas apresentavam fenótipo dinâmico compatível com o que é descrito para VIC, foi realizado um ensaio de indução da transição de qVIC para aVIC, por meio da verificação do aumento da expressão de alfa-SMA pelas células. Para isso, células isoladas a partir de explante de cúspide foram plaqueadas na densidade de 3×10^3 células por poço de uma placa de 96 poços. Cerca de 24 horas depois do plaqueamento, o meio MegaCell foi substituído por meio DMEM suplementado (10% de SFB, 2 mM de L-Glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e as células foram mantidas em estufa durante 4 dias. Ao término desse período, as células foram fixadas com PFA 4%. Após a fixação, as amostras foram lavadas com PBS e bloqueadas com solução de PBS 1% de BSA por 60 min. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo contra alfa-SMA (1:250), vimentina (1:200) e CD31 (1:200) por 60 min, e posteriormente expostas a anticorpo secundário Alexa fluor 546 (1:600) pelo mesmo período de tempo. As análises foram realizadas em microscópio invertido DMI6000B. Nesses ensaios, células cultivadas nas condições padrão (placas recobertas com filme de colágeno e meio MegaCell suplementado) foram utilizadas como controle.

2.1.11 Avaliação da capacidade de recelularização dos tecidos descelularizados com células-tronco mesenquimais e células intersticiais de válvula cardíaca

Para essa etapa do trabalho, foram utilizadas CTMs (Lonza) (passagens 5 a 8) cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, bem como VIC (doador A - passagem 3) cultivadas como descrito no item 2.1.9. Assim que os cultivos atingiram 80% de confluência as células foram lavadas com BSS-CMF e desprendidas da superfície de cultura utilizando solução de tripsina e EDTA. Em seguida, as células individualizadas foram contadas e preparadas em uma suspensão contendo 50,000 mil células a cada 30 µl de meio DMEM, para CTMs, ou meio MegaCell, para VIC. O volume de 30 µl dessa suspensão foi distribuído em cada poço de uma placa de gota pendente (Nunc). Em seguida, fragmentos de 3-4 mm² de cúspide dos grupos VPD-S e VPD-B foram colocados nos poços contendo o meio com células. Tais fragmentos haviam sido previamente cortados e mantidos em meio DMEM ou MegaCell basal por 24 h a 4°C. Posteriormente a placa foi cuidadosamente invertida e mantida em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Ao término desse período, os fragmentos de tecido foram transferidos para placa de 6 poços *ultra-low attachment*, contendo 2 mL de meio DMEM ou MegaCell suplementado e colocados em incubadora.

Os co-cultivos foram mantidos por 7 e 15 dias com CTMs, e por 15 com VIC. No final de cada período os tecidos foram removidos das placas, lavados em PBS estéril e fixados em PFA 4% por 15 minutos. Para a análise da recelularização dos tecidos, os mesmos foram colocados em meio Tissue Tek O.C.T. compoud, congelados a - 80°C e em seguida levados ao criostato para realização de cortes histológicos em tamanhos de 10 e 15 µm. As lâminas obtidas com tecido recelularizado com VIC foram marcadas com anticorpo alfa-SMA (1:250) e DAPI. Para os experimentos com CTMs foram realizadas imunoflorescências para verificação de CD105 (1:100, BD Biosciences) e de Pró-colágeno I (1:50, Collagen(Pro)Type I M-38, Interphase). Adicionalmente, a proliferação das CTMs nos tecidos foi verificada a partir da marcação com anticorpo anti-ki67 (1:200, Abcam). As preparações histológicas foram analisadas em microscópio invertido DMI6000B (Leyca Microsystems, Wetzlar, Germany). Os ensaios de co-cultivo com CTMs foi realizado em triplicata biológica, ao passo que os experimentos de colonização por

VIC foram realizados em duplicata biológica (duas ou três amostras de cúspide porcina de cada grupo descelularizado).

Para a determinação quantitativa da recelularização das cúspides, as secções histológicas obtidas foram fotografadas no aumento de 10X a fim de registrar toda a extensão do corte. Em seguida, o número de células presentes no interior de cada secção foi contado manualmente. As células e agregados celulares presentes na periferia dos fragmentos foram excluídos da contagem. Posteriormente, a área de cada secção foi definida usando o software NIH ImageJ v. 1.45s, para permitir a análise do número de células/área de tecido.

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Os protocolos de descélularização apresentam diferenças de eficiência na remoção do conteúdo celular e do DNA dos tecidos

Os dois métodos de descélularização aplicados neste estudo foram realizados em condições estéreis e resultaram na obtenção de válvulas esbranquiçadas que mantiveram a estrutura macroscópica intacta e consistente. O protocolo de etapa única realizado no grupo VPD-S levou cerca de 72 horas enquanto o protocolo combinado, VPD-B, levou cerca de 104 horas de experimento contínuo. Ao término dos processos, os tecidos dos dois grupos passaram por mais 10 dias de lavagem para remoção das soluções de descélularização. Para determinar com precisão a eficiência das metodologias de descélularização foi realizada a extração e quantificação do DNA que permaneceu nos tecidos após os tratamentos. Nesse ensaio, os enxertos foram divididos e avaliados em três regiões valvares separadas (cúspide, conduto e músculo). Nos tecidos do grupo VPD-S o processo de descélularização levou a redução significativa na quantidade de DNA presente nas regiões do conduto (-42%) e do músculo (-37,29%) (Figura 2.1 B, C), enquanto nas cúspides essa diminuição não foi verificada (Figura 2.1 A). Por outro lado, o processo de descélularização prolongado utilizando a nuclease levou a remoção de mais de 90% do DNA de todas as regiões valvares analisadas. Os dados obtidos a partir da extração revelaram uma diminuição de 96,72%, 98,11% e 93% de DNA no conduto, cúspides e músculo das amostras VPD-B, respectivamente (Figura 2.1 A, B, C). Adicionalmente, a recuperação do *spike* de DNA apresentou médias entre 70 e 120%, estabelecendo a confiabilidade do protocolo de extração de DNA genômico utilizado (Figura 2.1).

Após a quantificação do DNA presente nos tecidos acelulares, foi realizada uma eletroforese para verificar possíveis diferenças na fragmentação do DNA induzida pelas soluções de descélularização. Nesse experimento, foi possível observar a presença de bandas de DNA acima de 300 pb em todas as amostras de tecido nativo e rastros de DNA nas amostras do grupo VPD-S, sugerindo a degradação desse material, bem como a sua permanência nos tecidos após o tratamento. Já nas amostras do grupo VPD-B, não foram verificadas quaisquer bandas de DNA acima de 123 pb (Figura 2.2).

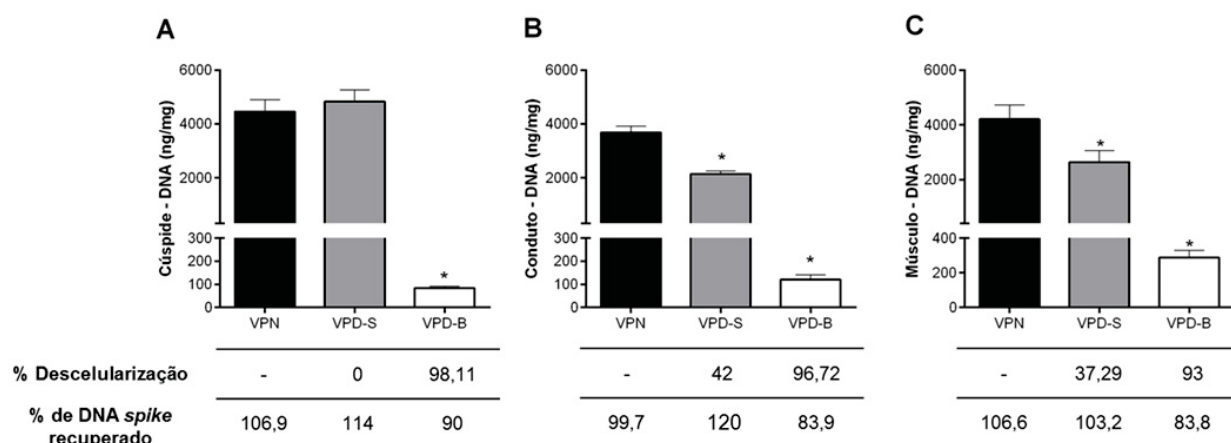


Figura 2.1 Quantificação do DNA residual extraído das três regiões valvares após a descclularização pelo protocolo de etapa única (VPD-S) e protocolo combinado (VPD-B) em comparação a válvulas nativas não descclularizadas (VPN). (A) Quantidade de DNA presente nas cúspides de cada grupo; (B) Quantidade de DNA presente no conduto de cada grupo; (C) Quantidade de DNA presente no músculo de cada grupo. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n=3), segundo análise utilizando ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnett, * indica valor de $p < 0,05$.

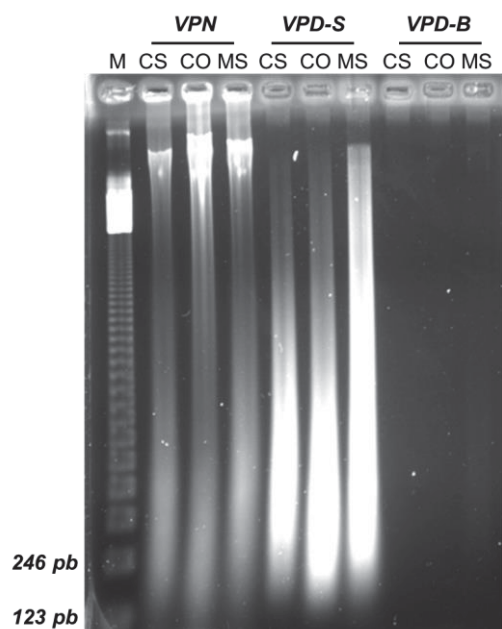


Figura 2.2. Eletroforese em gel de agarose 1% realizada com DNA extraído de amostras, sem *spike*, de cúspide (CS), conduto (CO) e músculo (MS) dos grupos descclularizados pelo protocolo de etapa única (VPD-S) e protocolo combinado (VPD-B) em comparação a válvulas nativas não descclularizadas (VPN). Marcador de DNA (M): 123 pb DNA ladder (Invitrogen).

Dado que a presença de fragmentos de DNA não implica em que células intactas tenham permanecido nos tecidos, a retenção de células íntegras foi avaliada por meio da marcação dos núcleos celulares utilizando as colorações de H&E e DAPI. Ao analisarmos as amostras do grupo VPN, verificamos que, como esperado, há núcleos distribuídos por toda a extensão da válvula nativa, evidenciados pela coloração de H&E (núcleos corados em tom azul-arroxeadado) (Figura 2.3 A, D e G) e marcação com DAPI (núcleos emitem fluorescência azul) (Figura 2.3 J, M, P). Já em tecidos do grupo VPD-S, observou-se marcação positiva para núcleos apenas na região central do corte de músculo, (Figura 2.3 H, Q) e ausência de material nuclear nas demais regiões (Figura 2.3 B, E, K, N). Por fim, em válvulas descelularizadas do grupo VPD-B, não foi possível detectar a permanência de núcleos celulares íntegros em nenhuma das regiões analisadas (Figura 2.3 C, F, I, L, O, R).

Ainda que os protocolos de descelularização tenham removido parte significativa das células e do DNA tecidual, é importante verificar a presença de outros componentes celulares que possam ter permanecido ancorados aos tecidos tratados. Nesse sentido, experimentos para detecção do antígeno alfa-Gal (carboidrato de tecido animal) e da vimentina (proteína de citoesqueleto) foram conduzidos. Os resultados obtidos confirmaram a presença do alfa-Gal (fluorescência verde) em todas as regiões das válvulas nativas (Figura 2.4 A, D, G). Após os tratamentos, essa marcação não foi mais observada nas cúspides e condutos dos grupos descelularizados (Figura 2.4 B, C, E, F). Porém, remanescentes desse antígeno permaneceram na região muscular dos enxertos tratados (Figura 2.4 H, I). Como controle da marcação, cortes de intestino porcino foram utilizados para confirmação da eficiência da isolectina B4 (Figura 2.4 J). Quanto aos ensaios para detecção de vimentina, nos cortes analisados observamos marcações positivas para essa proteína (fluorescência em vermelho) na cúspide, conduto e músculo das válvulas nativas (Figura 2.5 A, D, G), assim como, no conduto e músculo dos grupos VPD-S (Figura 2.5 E, H) e VPD-B (Figura 2.5 F, I). As cúspides descelularizadas não apresentaram remanescentes de vimentina (Figura 2.5 B, C).

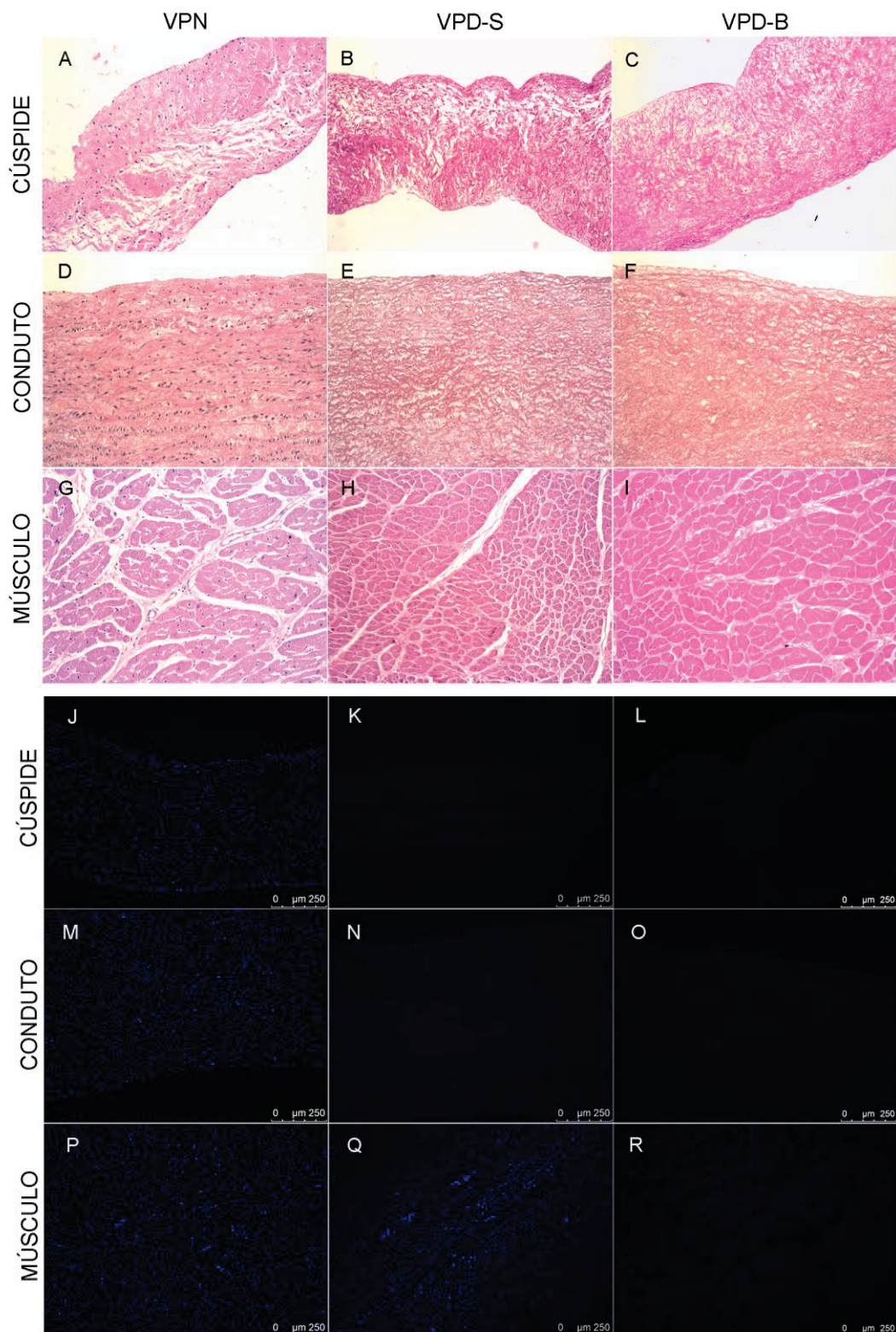


Figura 2.3. Cortes histológicos de válvulas nativas e descelularizadas corados com H&E e DAPI. Secções coradas com H&E (A, D, G) e DAPI (J, M, P) mostrando a distribuição de núcleos nas três regiões das válvulas cardíacas nativas. Secções do grupo descelularizado VPD-S mostrando ausência de marcação nuclear em cúspides e condutos corados com H&E (B, E) e DAPI (K, N) e presença de núcleos no músculo valvar (H, Q). Secções coradas do grupo descelularizado VPD-B não evidenciaram quaisquer marcações positivas para núcleos (C, F, I, L, O, R). Imagens de coloração com H&E foram obtidas em aumento de 200X. Na coloração de H&E os núcleos são corados em tom azul-arroxeadado e o citoplasma em tom róseo-avermelhado. Na marcação com DAPI os núcleos emitem fluorescência azul. n=6.

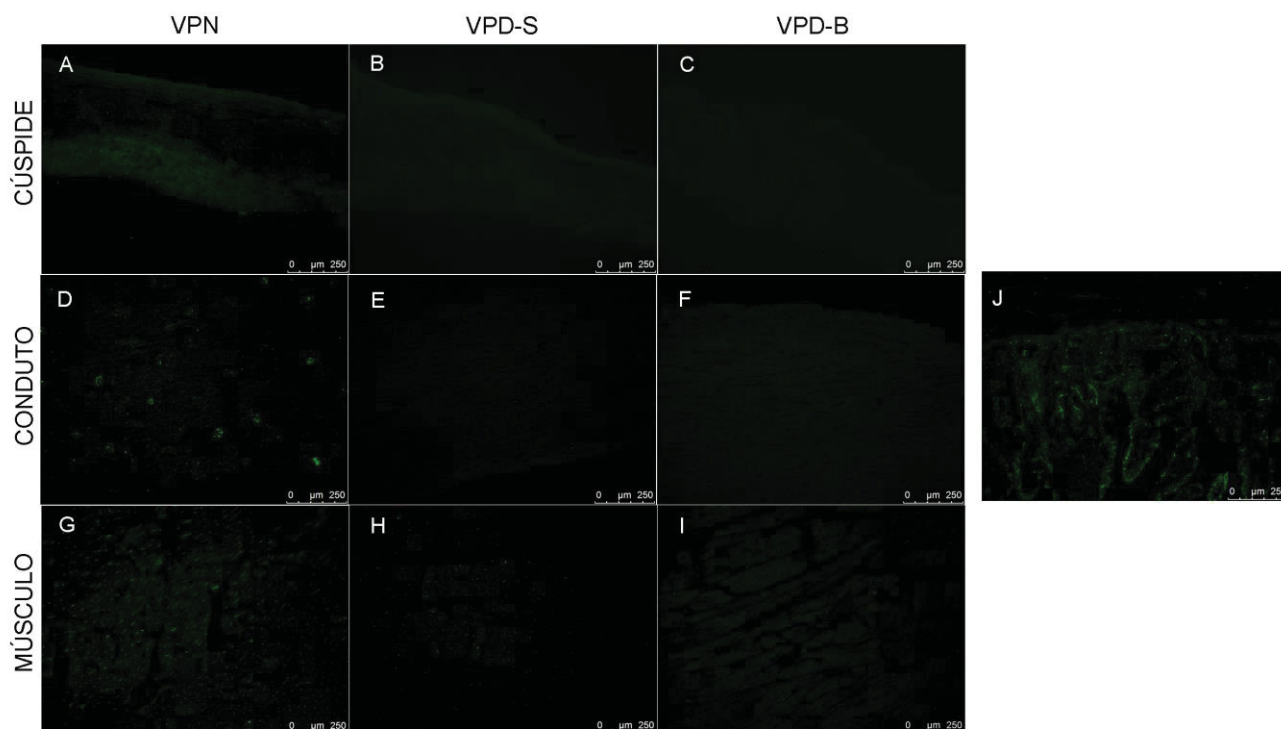


Figura 2.4. Detecção do antígeno alfa-Gal utilizando Isolectina B4. Imagens representativas de secções histológicas marcadas com isoelectina evidenciando a presença de alfa-Gal (verde) na cúspide (A), conduto (D) e músculo (G) das válvulas nativas e as mesmas regiões valvares testadas após os tratamentos descelerizantes: cúspide (B), conduto (E) e músculo (H) VPD-S e cúspide (C), conduto (F) e músculo (I) VPD-B. Cortes histológicos de intestino porcino foram utilizados como controles de marcação (J). n=3.

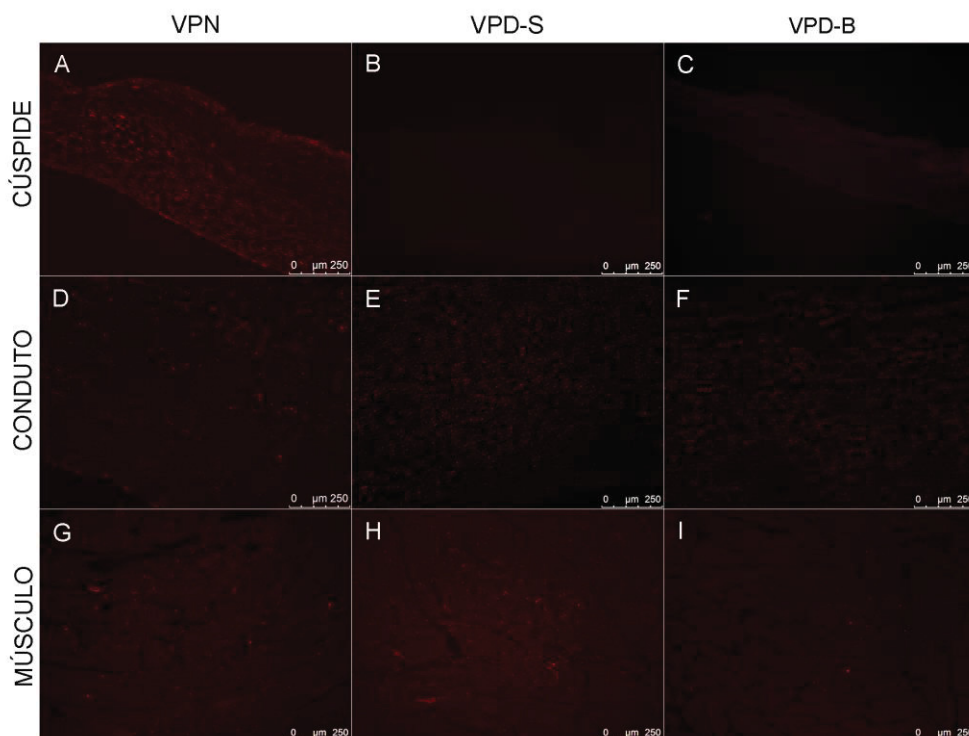


Figura 2.5. Imunofluorescência para detecção de vimentina nas cúspides e condutos valvares nativos e descelerizados. Imagens representativas de secções histológicas marcadas com anticorpo anti-vimentina (vermelho) demonstram a distribuição dessa proteína nas cúspides (A), condutos (D) e músculo (G) valvares nativos. Remanescentes de vimentina podem ser observados em condutos e músculo VPD-S (E, H) e condutos e músculos VPD-B (F, I). Não foram observados resíduos dessa proteína nas cúspides VPD-S (B) e VPD-B (C). n=3.

Quanto às marcações para colágeno I (fluorescência em vermelho), nos tecidos nativos verificou-se a predominância dessa molécula na camada fibrosa (f) das cúspides e na camada adventícia (Ad) dos condutos (Figura 2.7 A, D). Essa distribuição também foi verificada nos grupos descelularizados, entretanto, a estrutura fibrilar do colágeno presente nas cúspides das válvulas nativas pareceu ligeiramente desorganizada após o tratamento de VPD-S (Figura 2.7 B, E) e praticamente ausente no grupo VPD-B (Figura 2.7 C, F). Nesse último grupo, apenas marcações esparsas indicando a presença dessa molécula foram observadas.

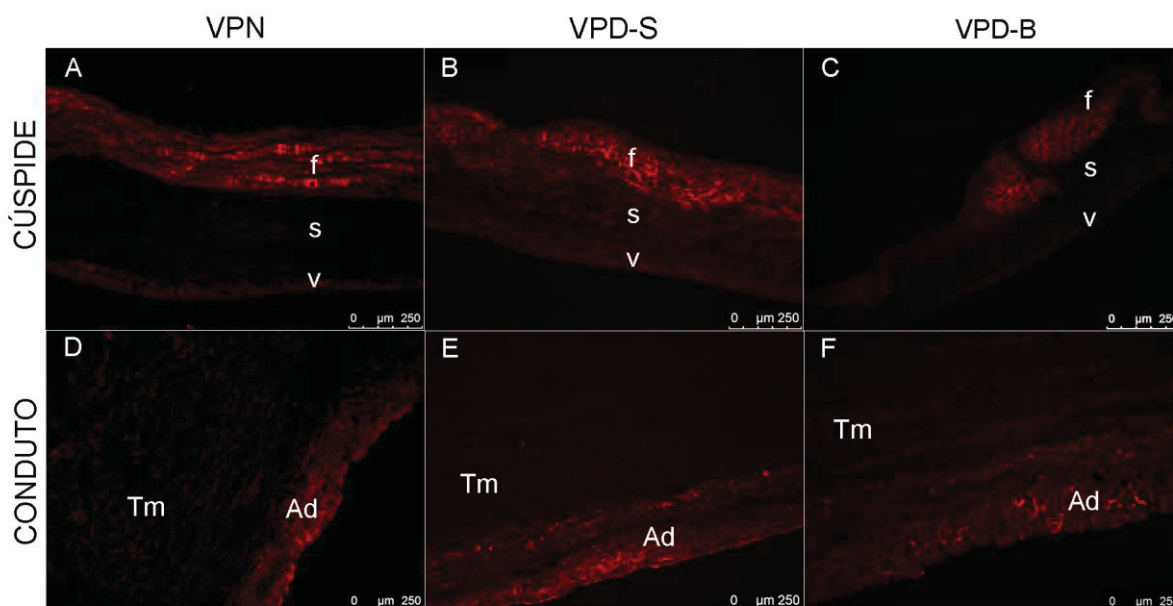


Figura 2.7. Imunofluorescência para detecção de colágeno I nas cúspides e condutos valvares nativos e descelularizados. Imagens representativas de secções histológicas marcadas com anticorpo anti-colágeno I (vermelho) evidenciando o predomínio dessa molécula na camada fibrosa (f) das cúspides nativas (A) e descelularizadas (B,C) e na camada adventícia (Ad) dos condutos valvares (D-F). (s) esponjosa; (v) ventricular; (Tm) túnica média. n=3.

Nas amostras nativas coradas com PAS/Alcian Blue, observamos a presença de GAG (coloração azul) principalmente na camada esponjosa (s) das cúspides e ao longo de todo o conduto valvar (Figura 2.8 A, D). A distribuição desse polímero parece ter sido afetada pelos protocolos de descelularização, uma vez que a coloração apresentou-se reduzida nas cúspides do grupo VPD-S (Figura 2.8 B) e nas cúspides e condutos do grupo VPD-B (Figura 2.8 C, F). Os condutos do grupo VPD-S corados com PAS/Alcian Blue apresentaram distribuição de GAG semelhante aos condutos nativos (Figura 2.8 E).

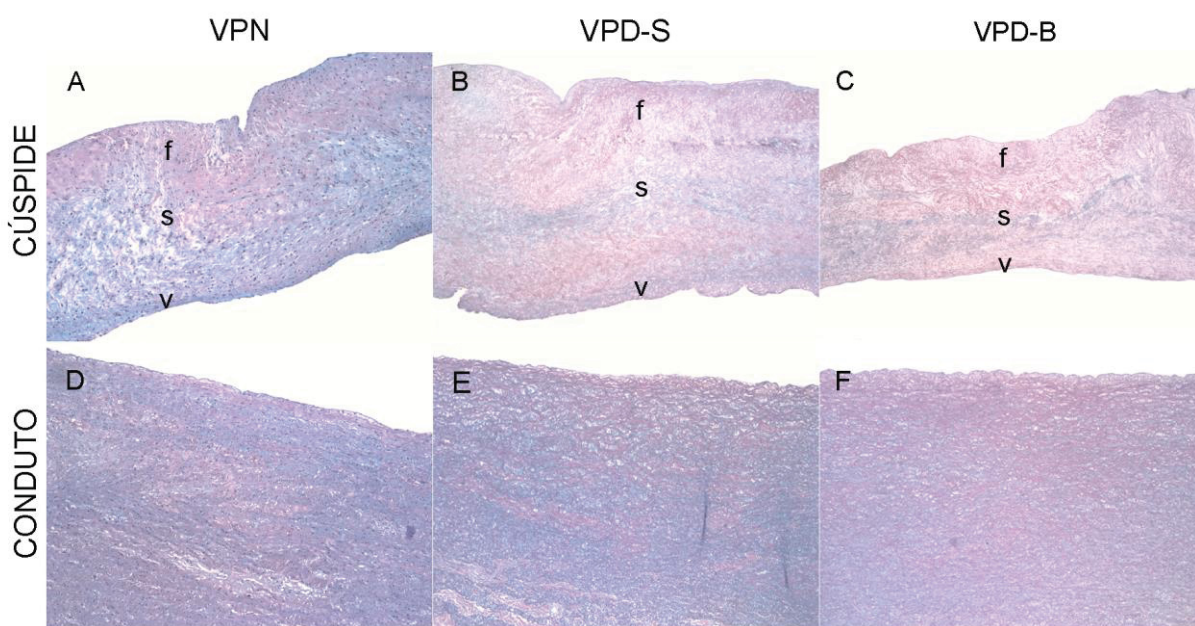


Figura 2.8. Secções de válvulas cardíacas coradas com PAS/Alcian Blue para marcação de GAG. As imagens demonstram a distribuição predominante de GAG na camada esponjosa (s) das cúspides nativas (A) e descclularizada VPD-S (B) e redução na coloração dos tecidos descclularizados VPD-B (C). Imagens representativas de condutos corados para detecção de GAG em tecidos nativos (D) e descclularizados (E,F). Magnificação: 200X; GAG: azul; Membrana basal: magenta. n=3.

Ainda durante a etapa de avaliação da matriz extracelular, foram realizadas análises de ultraestrutura para verificar possíveis danos teciduais às válvulas descclularizadas. Através das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, é possível observar uma camada confluyente de células endoteliais na superfície das cúspides e na face luminal dos condutos valvares nativos (Figura 2.9 A, D). Em contrapartida, após os processos de descclularização, não foram observadas células recobrindo tais superfícies (Figura 2.9 B, C, E, F). Nos tecidos obtidos do grupo VPD-S, observamos que a superfície das cúspides apresentou um arranjo compacto e ininterrupto de matriz (Figura 2.9 B) enquanto na face luminal dos condutos algumas rupturas parecem ter ocorrido (Figura 2.9 E). No grupo VPD-B as cúspides apresentaram uma organização mais rugosa quando comparadas ao grupo VPD-S (Figura 2.9 C) e os condutos parecem ter sido intensamente afetados após a descclularização, já que rompimentos nas fibras da MEC foram observados em vários pontos do tecido (Figura 2.9 F).

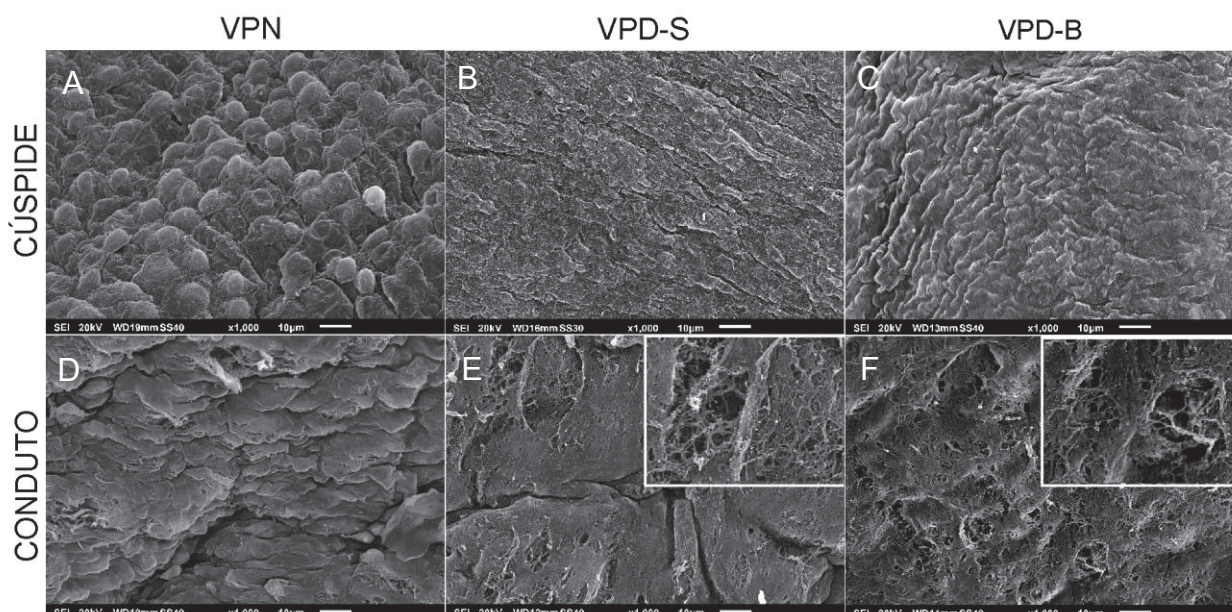


Figura 2.9. Análise ultraestrutural da matriz de válvulas nativas e descélularizadas. As imagens evidenciam o revestimento da cúspide (A) e do conduto (D) com células endoteliais nas válvulas nativas. Aspecto da superfície externa da cúspide (B) e do conduto (E) descélularizado VPD-S e da cúspide (C) e conduto (F) VPD-B, observa-se a completa ausência da camada endotelial e a organização dos tecidos após a descélularização, as rupturas no tecido do conduto estão destacadas no recorte das imagens E e F . n=3.

2.2.3 As válvulas descélularizadas não apresentaram citotoxicidade

Ambos os protocolos utilizados para descélularizar as válvulas cardíacas contêm SDS, um detergente capaz de dissolver as membranas celulares, por isso, a permanência desse componente após os tratamentos pode levar a citotoxicidade. Para avaliar o potencial citotóxico dos enxertos obtidos, realizamos os ensaios preconizados pela ISO 10993/5. Ao final do teste de contato direto observamos que as células BALB/c 3T3 cresceram próximas aos fragmentos descélularizados dos grupos VPD-S e VPD-B (Figura 2.10 B, C) e não mostraram evidências de alteração na morfologia quando comparadas às células cultivadas sozinhas (controle negativo) (Figura 2.10 D). É importante ressaltar que no caso do controle negativo, o cultivo celular foi iniciado um dia antes do cultivo entre células e tecidos, razão pela qual há maior confluência celular nos poços do controle negativo em comparação aos demais. Por outro lado, os fragmentos de válvula nativa induziram a morte das células na zona ao redor dos tecidos (Figura 2.10 A) exibindo comportamento semelhante ao obtido com o controle positivo (100 ng/µl de SDS) no qual todas as

células morreram (Figura 2.10 E). Já no ensaio de citotoxicidade induzida por extrato, é possível observar que as células expostas em a todas as concentrações de extrato de válvula VPD-S e VPD-B apresentaram viabilidade acima de 90% (Figura 2.10 G, H). Em contrapartida, o extrato de válvula nativa utilizado na maior concentração levou a morte de 100% das células (Figura 2.10 F).

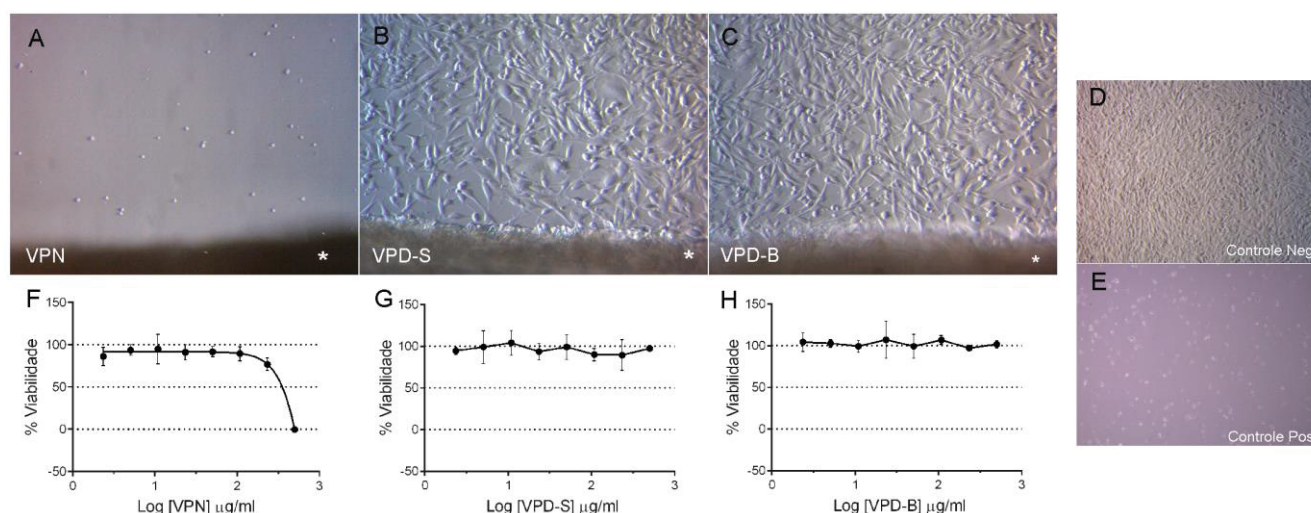


Figura 2.10. Ensaios de citotoxicidade com válvulas porcinas nativas e descclularizadas. (A-C) Morfologia das células BALB-3T3 após 72 horas em cultivo no teste de contato direto, *tecido aderido ao fundo da placa; Morfologia das células BALB-3T3 cultivadas em condições padrão (controle negativo) (D) e expostas à 100 ng/μl de SDS (controle positivo) (E). Análise da viabilidade celular pelo método do vermelho neutro após tratamento com extrato de válvulas nativas (F) e descclularizadas VPD-S (G) e VPD-B (H) por 48 horas. n=3

2.2.4 As válvulas descclularizadas não induziram a proliferação de células imunes *in vitro*

Para avaliação da resposta imune celular estimulada pelos tecidos porcinos foram utilizadas PBMCs. A população de PBMCs é composta de monócitos (~10%), células Natural Killer (~10%) e linfócitos T e B (~80%) (Autissier et al. 2010). Em conjunto, essas células desempenham um importante papel na resposta imune contra infecção e preservam a homeostase do hospedeiro (Zhou et al. 2016). Embora a utilização *in vitro* de PBMCs não mimetize completamente a resposta imune *in vivo*, a resposta proliferativa está entre os eventos celulares que indicam a sua ativação.

Os ensaios de proliferação baseados em CFSE conduzidos neste trabalho objetivaram verificar o impacto dos tecidos descclularizados porcinos nas células

imunes humanas. Nossos dados mostraram que ao final de 5 dias de ensaio, não houve indução significativa da proliferação de PBMCs após o co-cultivo dessas células com condutos porcinos preparados na forma de extrato (Figura 2.11 A) ou na forma de fragmentos íntegros (Figura 2.11 B). A ausência de indução de proliferação foi verificada em todos os grupos experimentais, incluindo o grupo VPN cujos tecidos contém uma grande quantidade de células porcinas. Os níveis de proliferação celular dos grupos testados mantiveram-se semelhantes aos níveis de proliferação celular espontânea (Ctl-). Ainda assim, a capacidade das células proliferarem foi confirmada com a adição de PHA (controle positivo de proliferação).

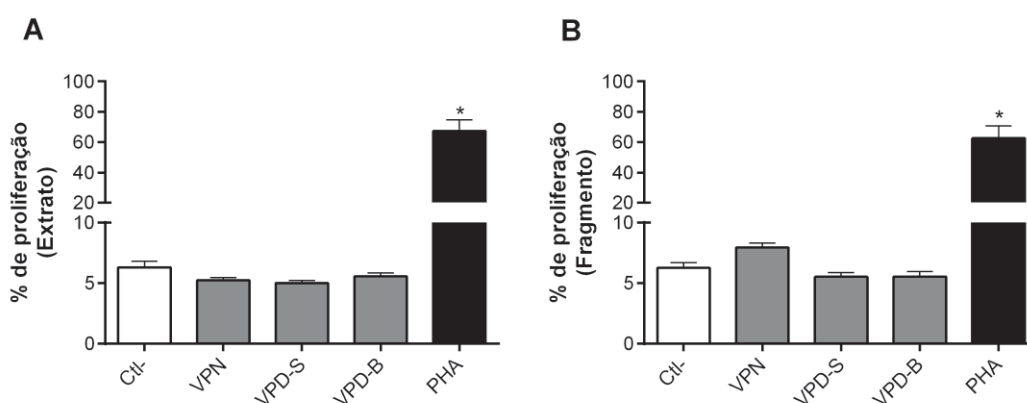


Figura 2.11. Ensaio de proliferação de PBMCs. (A) Efeito da exposição de PBMCs ao extrato de conduto porcino nativo (VPN) e descelularizado (VPD-S e VPD-B) por 5 dias; (B) Efeito da exposição das PBMCs a fragmentos de 4 mm² de conduto porcino nativo (VPN) e descelularizado (VPD-S e VPD-B) por 5 dias. Em paralelo, as PBMCs foram cultivadas sozinhas (Ctl-) ou estimuladas com PHA (controle positivo). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n=3), segundo análise utilizando ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Dunnet.

2.2.5 As cúspides descelularizadas funcionaram como arcabouço para adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais humanas

No presente trabalho, a análise da biocompatibilidade dos tecidos acelulares deu-se por meio de ensaios de recelularização/co-cultivo das cúspides porcinas com CTMs humanas. Tais experimentos foram conduzidos por 7 e 15 dias a fim de verificar de maneira temporal a capacidade de adesão das células aos tecidos, bem como a possibilidade de migração e/ou proliferação das mesmas ao longo do experimento. Ao analisarmos as secções de tecido recelularizado nos dois tempos, observamos uma camada contínua de células aderidas por toda periferia das

preparações VPD-S e VPD-B (Figura 2.12 A-L). Entretanto, as imagens indicam que a distribuição celular não foi completamente homogênea nos tecidos, já que aglomerados celulares podem ser observados em regiões diferentes dos cortes (Figura 2.12 A, C, D, J). Ademais, marcações positivas para núcleos também foram observadas no interior dos fragmentos sugerindo que as CTMs foram capazes de migrar para camadas mais internas do arcabouço. Entretanto, essa possível migração parece ter sido mais eficiente em amostras VPD-S, nas quais se observa uma maior quantidade de células tanto em 7 quanto em 15 dias quando comparados a recelularização ocorrida em VPD-B (Figura 2.12 A-L). Adicionalmente, as lâminas utilizadas para verificação da biocompatibilidade também foram incubadas com anticorpo anti-CD105 (marcador de CTMs), nesse ensaio observamos que nem todas as células presentes no tecido apresentaram marcações positivas para essa molécula. A maior parte das células CD105-positivas encontra-se na periferia dos fragmentos (Figura 2.12).

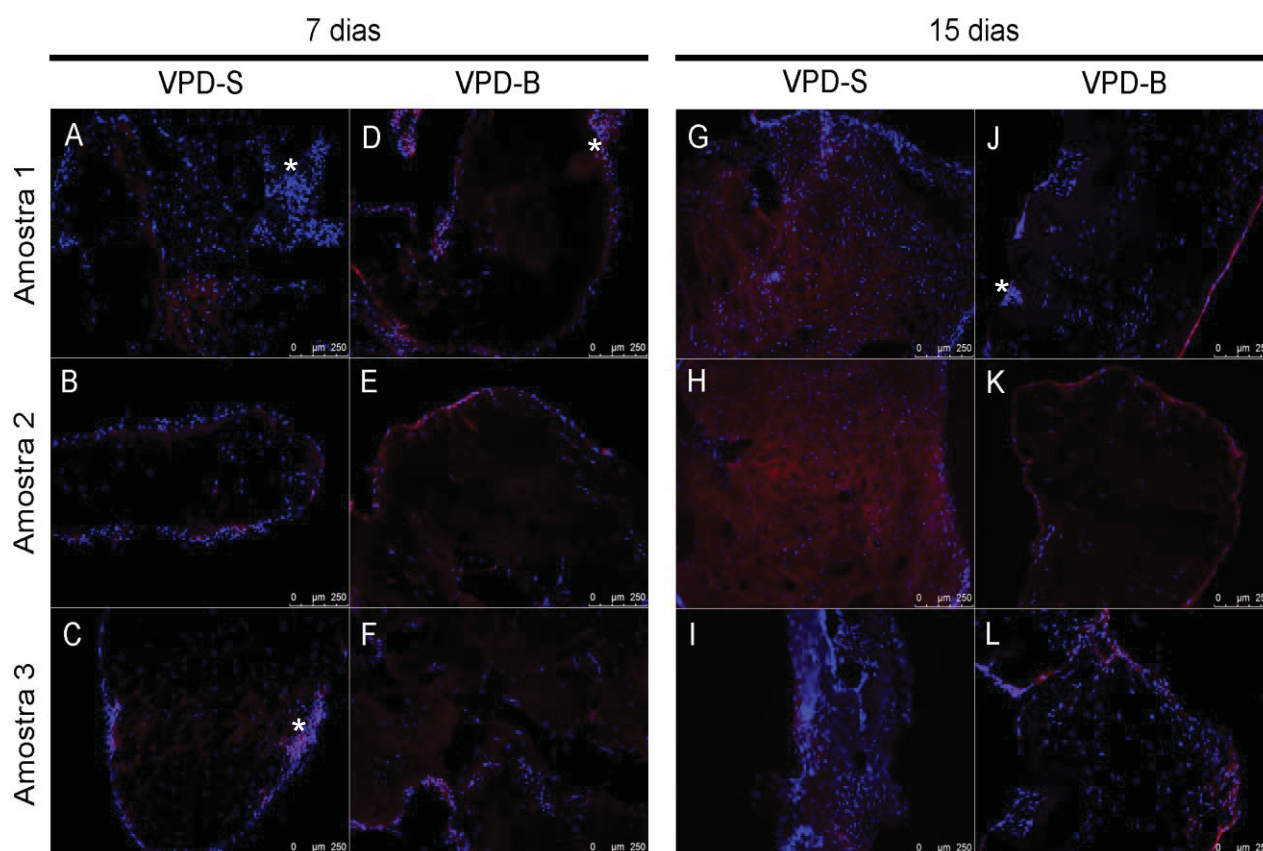


Figura 2.12. Avaliação da capacidade de células-tronco mesenquimais em recelularizar cúspides valvares descelularizadas. Imagens representativas de cúspides removidas de três animais diferentes e descelularizadas por meio de dois processos distintos VPD-S e VPD-B. O co-cultivo foi realizado com CTMs por 7 (A-F) e 15 (G-L) dias. DAPI: azul; CD105: vermelho. O * indica a presença de agregados celulares nas amostras.

A adesão de CTMs nos arcabouços valvares também foi confirmada através de microscopia eletrônica de varredura. Após 7 dias de ensaio observamos células distribuídas sobre a superfície das cúspides recelularizadas VPD-S e VPD-B e algumas regiões nas quais a matriz permaneceu exposta (Figura 2.13 A, C). Já ao término de 15 dias de experimento, uma camada confluenta de células pode ser verificada revestindo completamente a superfície tecidual de ambos os grupos (Figura 2.13 B, D).

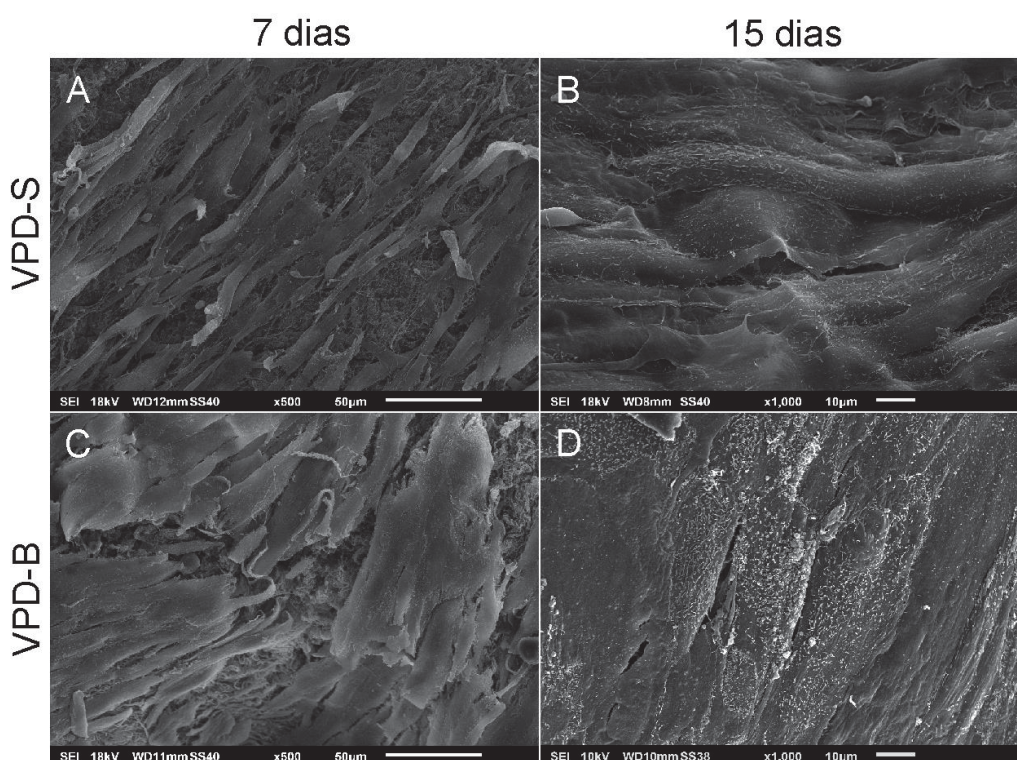


Figura 2.13. Recelularização de cúspides descclularizadas com células-tronco mesenquimais. Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura mostrando a superfície externa das cúspides valvares VPD-S recelularizadas por 7 (A) e 15 (B) dias e VPD-B recelularizadas por 7 (C) e 15 (D). n=3.

Após a análise qualitativa da colonização de cúspides descclularizadas com CTMs, realizamos a quantificação do número de células por área de tecido recelularizado após 7 e 15 dias de experimento. Os dados obtidos mostram que o número de células presentes em cúspides VPD-S foi superior ao número de células presentes em VPD-B após 7 dias de recelularização, entretanto essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa. Após 15 dias de ensaio o número de células presentes no interior das cúspides do grupo VPD-S foi significativamente

maior que o observado nos dois grupos depois de 7 dias e cerca de 3 vezes maior ao observado nas amostras VPD-B recelularizadas por 15 dias (Figura 2.14).

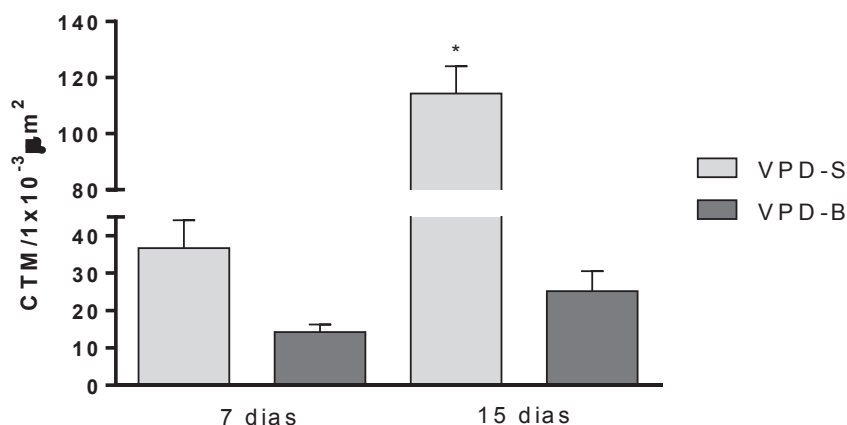


Figura 2.14. Avaliação quantitativa da colonização de cúspides descelularizadas por células-tronco mesenquimais. O gráfico representa o número de CTMs presentes por área de tecido após 7 e 15 dias de co-cultivo. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n=3), segundo análise utilizando ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, * indica valor de $p < 0,05$.

Na tentativa de confirmar diretamente a proliferação das CTMs nos arcabouços acelulares, novas amostras de tecido co-cultivado foram seccionadas e marcadas com anticorpo anti-ki67 (proteína encontrada no núcleo durante a divisão celular). Nos tecidos analisados, células em proliferação (fluorescência em vermelho) foram encontradas ao final de 7 dias de experimento tanto em amostras VPD-S quanto em VPD-B (Figura 2.15 A, B), porém, após 15 dias de ensaio, a proliferação celular só foi detectada em células presentes nas amostras VPD-B (Figura 2.15 C, D). Além disso, não foi possível avaliar quantitativamente se as CTMs proliferaram mais em um arcabouço que em outro, já que as marcações positivas foram escassas em todas as amostras. Paralelamente, a capacidade das células remodelarem a matriz descelularizada foi verificada através da incubação das secções de tecido com anticorpo anti-pró-colágeno I. O pró-colágeno I trata-se da forma precursora solúvel do colágeno I encontrada no citoplasma celular. Em nossos experimentos, verificamos que o pró-colágeno (fluorescência em vermelho) estava presente em CTMs aderidas aos tecidos VPD-S cultivados tanto por 7 quanto por 15 dias (Figura 2.16 A, B). Por outro lado, essa molécula só foi detectada em células aderidas aos tecidos VPD-B pelo período mais longo de cultivo (15 dias)

indicando que o remodelamento dessas cúspides ocorreu tardiamente em comparação às amostras VPD-S (Figura 2.16 C, D).

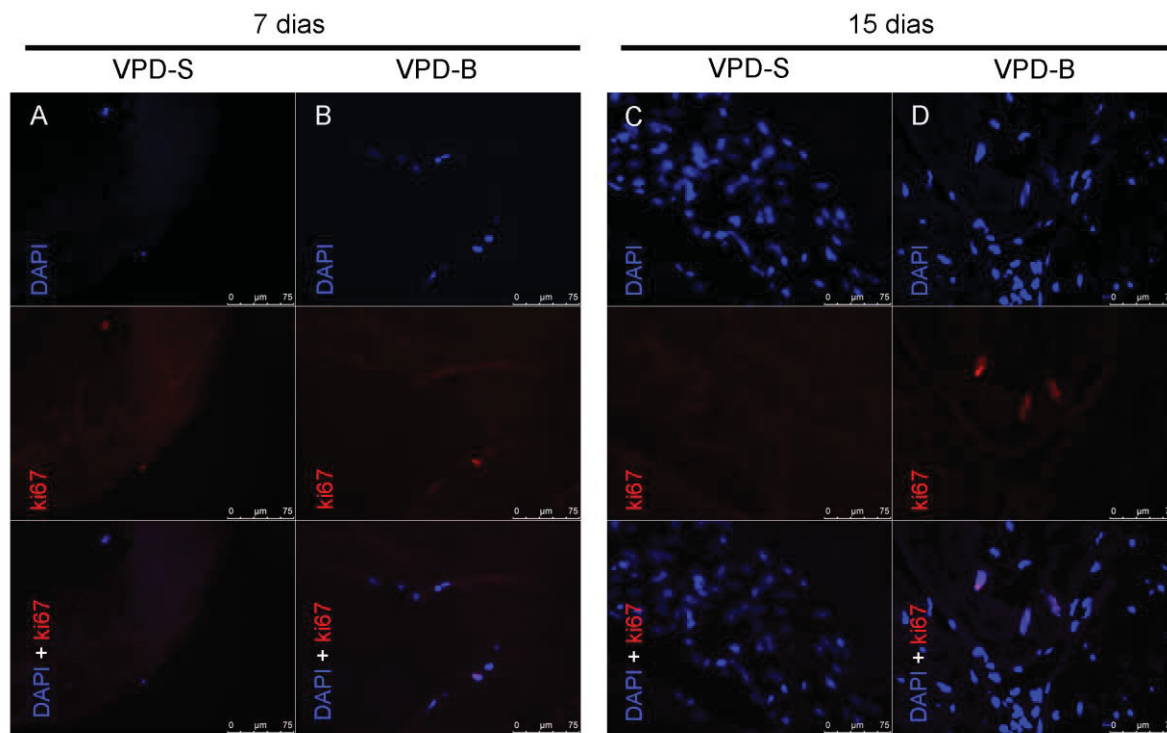


Figura 2.15. Marcação da proliferação de células-tronco mesenquimais em tecidos recelularizados utilizando anticorpo anti-ki67. Tecidos VPD-S (A) e VPD-B (B) recelularizados por 7 dias e VPD-S (C) e VPD-B (D) recelularizados por 15 dias. As marcações foram consideradas positivas quando houve co-localização. Nenhuma marcação foi observada em amostras VPD-S ao final de 15 dias de cultivo. DAPI: azul; ki67: vermelho.

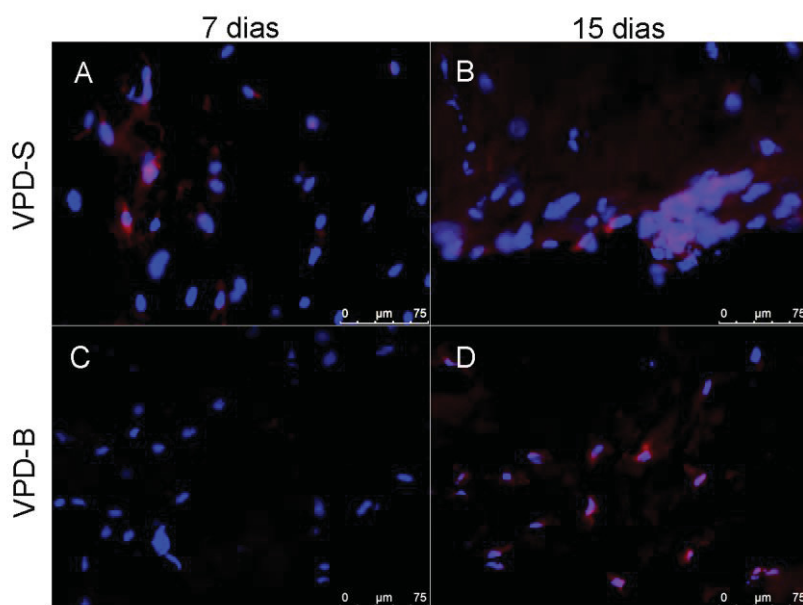


Figura 2.16. Imunofluorescência para verificação da presença de pró-colágeno I nas células-tronco mesenquimais aderidas aos tecidos descclularizados. Imagens representativas de tecidos VPD-S recelularizado com CTMs por 7 (A) e 15 dias (B) e tecidos VPD-B recelularizado com CTMs por 7 (A) e 15 (B) dias. DAPI: azul; pró-colágeno I: vermelho.

2.2.6 As cúspides descelularizadas funcionaram como arcabouço para adesão de células intersticiais de válvula cardíaca humana

Para que a recelularização dos arcabouços com células valvares fosse possível, inicialmente tais células foram isoladas a partir de explantes das cúspides da válvula mitral de um doador humano. As células que migraram a partir dos explantes foram submetidas à caracterização imunofenotípica após duas e sete passagens em cultivo. Os dados obtidos e apresentados na tabela 2-1 mostram que após duas passagens as células migradas foram positivas para os marcadores de fibroblastos e CTMs; CD105 e CD73, acima de 70%, e CD90 em cerca de 35% da população. As células cultivadas apresentaram ainda uma pequena porcentagem de marcação positiva para CD31 (~ 3%), marcador de células endoteliais, e para DDR-2 (4,32%), marcador de fibroblastos cardíacos. Enquanto a maior parte dos marcadores variou em menos de 5% na população entre as passagens 2 e 7, o cultivo dessas células até a sétima passagem aumentou proeminentemente a expressão de DDR-2 (de 4,32 para 15,3%) e diminuiu a expressão de CD90 (de 35,7% para 22,3%). Por fim, a porcentagem de marcação para alfa-SMA, marcador característico da ativação de VIC manteve-se inalterado (~3%) ao longo das passagens.

Tabela 2-1 Porcentagem de células isoladas da válvula mitral positivas para os marcadores nas passagens 2 e 7.

	CTM/Fibroblasto (%)			Endotelial (%)	Fibroblasto cardíaco (%)	aVIC (%)
Marcador	CD90	CD73	CD105	CD31	DDR-2	a-SMA
Passagem 2	35,7	89,8	71,1	3,17	4,32	2,99
Passagem 7	22,3	93,7	76,5	2,84	15,3	3,78

Como a ativação de VIC não ocorreu espontaneamente ao longo da cultura, realizamos ensaios de indução da transição fenotípica através da substituição do meio de cultivo padrão para meio DMEM. Adicionalmente, incluímos ensaios de imunofluorescência para marcação de vimentina e CD31 que são marcadores positivo e negativo de VIC, respectivamente. A análise dos cultivos celulares marcados para detecção de alfa-SMA (fluorescência em vermelho) mostra que essa

molécula estava expressa em uma pequena parte da população cultivada em meio MegaCell (Figura 2.17 A). Por outro lado, após quatro dias de cultivo em meio DMEM, uma maior quantidade de células expressando essa molécula foi detectada na cultura (Figura 2.17 D). Quanto às outras marcações, as preparações celulares foram positivas para vimentina (Figura 2.17 B,E) e negativas para CD31 (Figura 2.17 C,F) nas duas condições testadas.

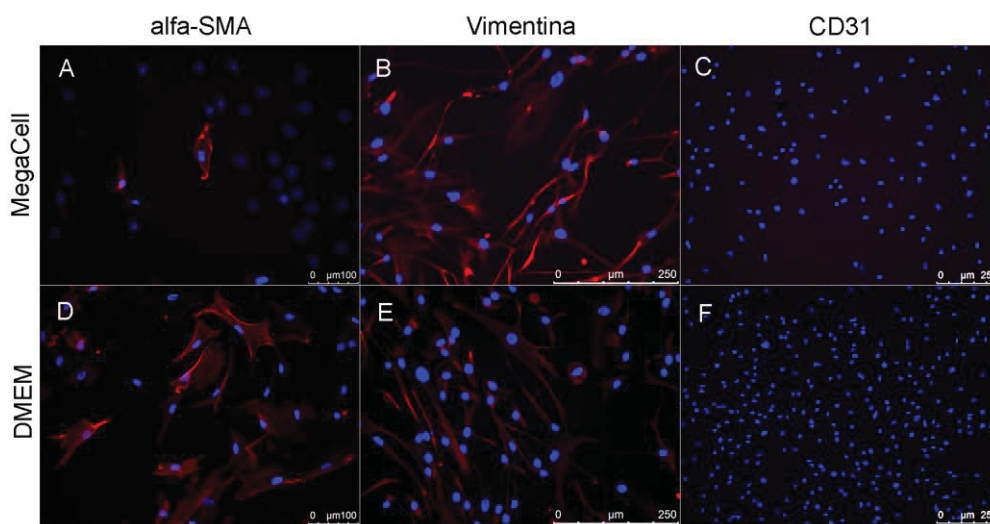


Figura 2.17. Análise da transição do fenótipo qVIC para aVIC induzido pela substituição do meio de cultivo. Imagens representativas de células isoladas da válvula mitral e cultivadas por 48 horas em meio MegaCell e marcadas para detecção de alfa-SMA (A), vimentina (B) e CD31 (C). Imagens representativas de células isoladas da válvula mitral e cultivadas por 48 horas em meio DMEM e marcadas para detecção de alfa-SMA (D), vimentina (E) e CD31 (F) DAPI: azul; alfa-SMA; vimentina; CD31: vermelho.

Após a etapa de caracterização, as VIC foram co-cultivadas com tecidos VPD-S e VPD-B durante 15 dias. Após esse período, os cortes histológicos realizados nas amostras revelaram que, assim como o observado nos ensaios utilizando CTMs, as VIC foram capazes de aderir nas matrizes descelularizadas de VPD-S e VPD-B formando uma camada contínua de células ao redor dos tecidos e foram capazes de migrar para camadas mais internas do arcabouço (Figura 2.18 A, C). Para verificar se o contato das células com as matrizes descelularizadas poderia levar diretamente a ativação de VIC, as amostras de tecido recelularizado foram incubadas com anticorpo contra alfa-SMA. As imagens obtidas demonstraram que apenas algumas células aderidas às cúspides VPD-S e VPD-B foram positivas para o alfa-SMA após 15 dias de co-cultivo (Figura 2.18 B, D). Ao contrário do observado nos experimentos com CTMs, a análise quantitativa da recelularização indicou que a

colonização feita por VIC não diferiu de acordo com o arcabouço utilizado. O número de células no interior dos fragmentos foi semelhante nos dois grupos testados (Figura 2.19). Além disso, comparando a recelularização obtida com VIC com a colonização feita por CTMs no mesmo período de tempo, observamos que, nas condições estabelecidas, as células-tronco apresentam maior capacidade de recelularizar os arcabouços valvares produzidos.

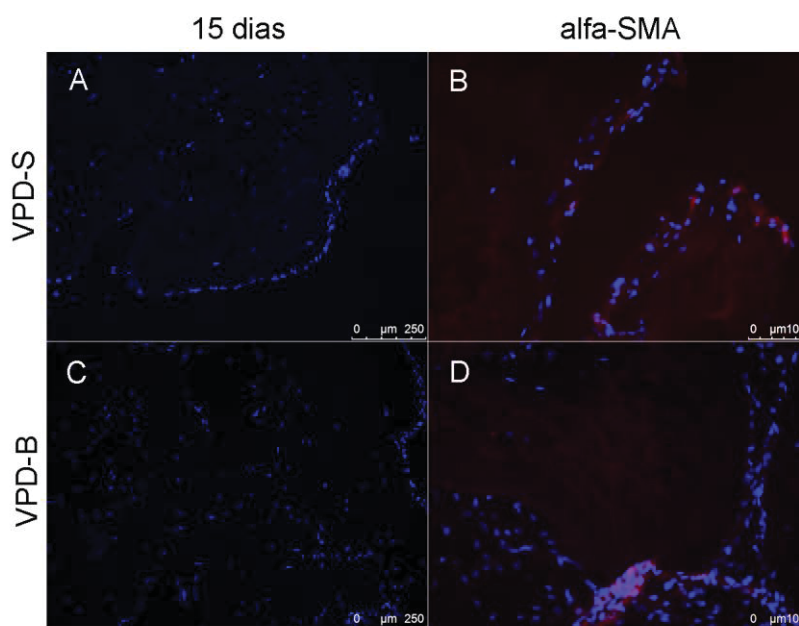


Figura 2.18. Recelularização de cúspides descelularizadas com células intersticiais de válvula cardíaca. Imagens representativas de cúspides obtidas dos grupos VPD-S (A) e VPD-B (C) co-cultivadas com VIC por 15 dias. Ao término desse período de tempo as amostras VPD-S (B) e VPD-B (D) foram marcadas para detecção de alfa-SMA. DAPI: azul; alfa-SMA: vermelho.

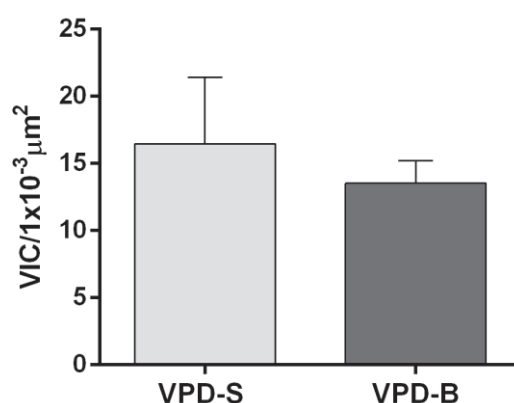


Figura 2.19. Avaliação quantitativa da colonização de cúspides descelularizadas por células intersticiais de válvula cardíaca. O gráfico representa o número de VIC presentes por área de tecido após 15 dias de co-cultivo. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n=2), segundo análise utilizando teste *t* de Student.

2.3 DISCUSSÃO

Neste trabalho, válvulas cardíacas pulmonares porcinas que foram dissecadas para formar uma prótese biológica única e implantável da base do ramo pulmonar até o conduto, foram submetidas a dois processos distintos de descclularização. No primeiro grupo (VPD-S), foi utilizado um modelo de descclularização baseado em SDS previamente patenteado (PI 0800603-2) e aplicado em válvulas humanas distribuídas pelo BVCHSC. No segundo grupo (VPD-B), elaboramos um protocolo de descclularização combinado, no qual foram utilizados um detergente (SDS), um agente osmótico (NaCl) e um agente enzimático (Benzonase), na tentativa de obter um xenoenxerto porcino completamente acelular e minimamente imunogênico. De acordo com Naso e Gandaglia (2018), as próteses valvares xenogênicas tem potencial para superar as limitações dos atuais modelos bioprostéticos, entretanto é preciso equilibrar o balanço entre a remoção eficiente do conteúdo celular e a manutenção da arquitetura do enxerto. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que ambos os protocolos foram capazes de produzir próteses biológicas com quantidades reduzidas de células íntegras e de DNA residual. Em termos de eficiência de remoção celular, o protocolo de descclularização combinado foi claramente superior ao protocolo de etapa única. Entretanto, a descclularização mais intensa implicou em maiores danos à MEC das válvulas.

O SDS, detergente utilizado nos dois protocolos, foi escolhido para aplicação nas válvulas cardíacas devido a sua eficácia na remoção de detritos celulares em tecidos densos e espessos (Akbari Zahmati et al. 2017; Alshaikh et al. 2019; Steenberghe et al. 2018). Entretanto, os enxertos tratados com o protocolo VPD-S, apresentaram redução de no máximo 42% de DNA nos condutos e músculos, e retenção de todo conteúdo de DNA das cúspides valvares. Mesmo que os enxertos tenham sido mantidos em agitação constante ao longo de todo protocolo de descclularização é possível que a entrada e transporte da solução de SDS através dos tecidos não tenha ocorrido eficientemente. Resultados semelhantes foram observados por Paniagua Gutierrez (2014) que verificaram a permanência de DNA residual em histologias de válvulas aórticas porcinas descclularizadas com solução de SDS 0,1% e agitação por 24 horas. Além disso, a forte tendência do DNA permanecer retido na matriz de arcabouços descclularizados (Gilbert, Freund, &

Badylak 2009) pode ter contribuído para os efeitos observados em válvulas VPD-S. Em um trabalho anterior do nosso grupo, a aplicação desse mesmo processo de descélularização produziu pericárdios bovinos histologicamente acelulares, porém, com parte do conteúdo de DNA (cerca de 30%) retido na matriz (Heuschkel et al. 2019). Em contrapartida, nos enxertos em que foi aplicado o protocolo combinado (VPD-B), além das três regiões valvares não apresentarem núcleos detectáveis, a remoção do DNA das válvulas foi superior a 93%. Nesse grupo, após o passo inicial de exposição ao SDS, os tecidos foram colocados em solução salina hipertônica e em seguida foram incubados com Benzonase. De fato, processos de descélularização que utilizam agentes descélularizantes combinados vêm sendo testados para aumentar a eficiência da descélularização e têm apresentado bons resultados. Recentemente, válvulas cardíacas humanas foram descélularizadas usando tampão hipotônico, 0,1% de SDS e 10 U/mL de Benzonase e os resultados obtidos mostraram redução de mais de 90% do DNA presente nos tecidos (Vafaei et al. 2018). Em outro estudo, a combinação entre uma solução de detergentes (1% SDS, 1% Triton X-100, 1% desoxicolato de sódio) com enzimas nucleases (RNase e DNase) também resultou em válvulas porcinas completamente acelulares e contendo poucos resíduos de DNA (Haupt et al. 2018).

A permanência de núcleos ou fragmentos de DNA nos tecidos acelulares foi previamente apontada como fator capaz de gerar reações inflamatórias *in vitro* e *in vivo* (Zheng et al. 2005). De fato, detritos de DNA encontrados em vários enxertos descélularizados tem o potencial de iniciar o processo de calcificação nos substitutos valvares (Paniagua Gutierrez et al. 2014; Schoen & Levy 2005), por isso a remoção dessa molécula é um fator chave para o desenvolvimento de arcabouços acelulares. Entretanto, outros componentes, como debris celulares, também são passíveis de iniciar uma resposta inflamatória após o transplante (Aristizabal et al. 2017; Daly et al. 2012). Os dados obtidos neste trabalho mostraram que os enxertos produzidos a partir dos dois protocolos de descélularização não estão completamente livres de remanescentes citoplasmáticos. A permanência de resíduos de alfa-Gal no músculo valvar é especialmente preocupante já que esse antígeno está envolvido nos processos de rejeição aguda e hiperaguda após transplantes xenogênicos (Platt et al. 1991). Infelizmente, muitos trabalhos envolvendo a descélularização de válvulas porcinas não realizam experimentos para detecção desse e de outros xenoantígenos dificultando a definição de um método de descélularização ideal para remoção desse

componente xenogênico. Recentemente, Liu e colaboradores (2018) avaliaram a remoção de componentes antigênicos de válvulas aórticas porcinas através de protocolos de descelularização baseados em SDS, Triton X-100 e desoxicolato de sódio. Os autores demonstraram a remoção eficiente de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e do alfa-Gal das válvulas descelularizadas, porém, os protocolos afetaram expressivamente a MEC valvar. Devido à dificuldade de se remover esses componentes de tecidos animais, novas estratégias como a deleção de genes por engenharia genética estão sendo estudadas para o desenvolvimento de tecidos porcinos humanizados (Cooper et al. 2018; Wolf et al. 2019).

Na tentativa de prever se os fragmentos celulares residuais presentes nos enxertos poderiam evocar uma resposta imune em pacientes receptores humanos, foram realizados ensaios *in vitro* para verificação da proliferação de células imunes induzida pelos tecidos acelulares. Os dados obtidos não apresentam quaisquer evidências de que as válvulas poderiam induzir a proliferação de PBMCs *in vitro*. Curiosamente, até mesmo os tecidos nativos não foram capazes de iniciar uma resposta proliferativa nessas células. Resultado semelhante já foi observado por Högerle e colaboradores (2018), nesse estudo os autores reportaram ausência de indução da proliferação de PBMCs após sete dias de co-cultivo com cúspides aórticas humanas criopreservadas. Em outro estudo, Seifert e colaboradores (2015), realizaram o co-cultivo de PBMCs humanas com fragmentos de cúspides porcinas por 5 dias. Os dados obtidos mostraram que a proliferação das células imunes induzida por tecidos porcinos só foi possível quando o ensaio foi realizado em combinação com um anticorpo anti-CD3. Apesar disso, a ausência de resposta proliferativa das PBMCs observada nesse estudo, não excluiu a possibilidade de que outras respostas celulares estejam acontecendo durante o ensaio tipo quais. Abordagens experimentais como dosagem de citocinas, avaliação da expressão de marcadores de ativação e até mesmo testes *in vivo* deverão ser conduzidas para determinar com clareza a imunogenicidade dos enxertos VPD-S e VPD-B.

Antes de iniciar os ensaios de biocompatibilidade foi necessário identificar se os enxertos produzidos apresentavam citotoxicidade. Recentemente, a análise desse parâmetro foi incluída dentro dos novos critérios para avaliação de arcabouços biológicos acelulares (Kawecki et al. 2018). De modo geral, a citotoxicidade induzida por matrizes descelularizadas é geralmente atribuída aos

resíduos de agentes químicos utilizados na descellularização. O SDS, por exemplo, é um importante agente citotóxico que possui alta afinidade a proteínas (Krejci 2007), ele pode ser liberado continuamente dos tecidos tratados podendo ser detectado nas amostras mesmo após várias lavagens (Caamaño et al. 2009). Apesar disso, em nossos experimentos, os tecidos obtidos a partir dos dois processos de descellularização não induziram citotoxicidade. Esses resultados corroboram com estudos anteriores nos quais válvulas cardíacas humanas e pericárdios bovinos descellularizados com solução de 0,1% de SDS, mesma concentração utilizada neste estudo, também não apresentaram citotoxicidade (Heuschkel et al. 2019; Vafaee et al. 2018).

Neste trabalho, os experimentos de caracterização das próteses descellularizadas também incluíram a análise da MEC por meio de MEV e imunofluorescência. Os arcabouços naturais, assim como as próteses descellularizadas, apresentam semelhanças mecânicas e estruturais que garantem propriedades hemodinâmicas muito próximas às das válvulas originais (Scleicher et al. 2009). Além disso, concentram uma série de moléculas sinalizadoras capazes de afetar a adesão, proliferação e diferenciação celular (Akhyari et al. 2011). Nesse sentido, uma descellularização que permita a retenção de moléculas da matriz valvar pode garantir não só a preservação da macro e microestrutura tecidual, mas também assegurar a capacidade de repopulação do enxerto por células do receptor e o desempenho do mesmo após o transplante (Navarro et al. 2010). Os dados obtidos neste trabalho demonstram que a descellularização aplicada no grupo VPD-S provocou discretas alterações na matriz das cúspides valvares afetando a organização do colágeno e reduzindo o conteúdo de GAG. Por outro lado, quando o protocolo VPD-B foi utilizado, observamos a redução da marcação para todos os componentes de MEC analisados além de rupturas teciduais nos enxertos, sugerindo a perda de parte dessas moléculas causada pelo processo combinado. Sabe-se que o SDS pode desfazer o domínio helicoidal triplo do colágeno (Bodnar et al. 1986; Rieder et al. 2004) e implicar na perda de alguns componentes de matriz, especialmente GAG (Gilbert 2012; Steenberghe et al. 2018), corroborando com os achados no grupo VPD-S. Contudo, apesar de possivelmente desorganizar a estrutura colágena, o SDS não está associado com a perda de colágeno em tecidos descellularizados (Gilbert et al. 2006). Dessa forma, as alterações causadas na matriz do grupo VPD-B podem estar relacionadas aos outros agentes

descelularizantes utilizados. Entretanto, não há dados reportando que soluções hipertônicas ou enzimas nucleases possam levar a perda de moléculas de matriz em processos de descclularização. Desse modo, é possível que a própria liberação de proteases durante o tratamento, que reconhecidamente podem levar a danos na estrutura da MEC (Boroumand et al. 2018), tenha causado esses efeitos.

Um dos principais desafios para o desenvolvimento de uma VCET trata-se do estabelecimento e crescimento de uma população celular fisiologicamente apropriada nas cúspides valvares (Jana et al. 2016). Dentre as estratégias escolhidas para recelularização de arcabouços biológicos, grande parte dos estudos empregam CTMs (Lanuti et al. 2015; Roosens et al. 2017; Xie et al. 2017). De fato as CTMs apresentam inúmeras vantagens, tais como as possibilidades de serem isoladas de fonte autóloga e de regular a resposta imune anti-doador (Podestà et al. 2019), além da capacidade de prolongar a sobrevivência de enxertos em modelos animais (Zhou et al. 2006). Adicionalmente, alguns dos estudos para o desenvolvimento de VCET foram dedicados a verificar a capacidade de diferenciação de CTMs em células interessantes para o microambiente valvar como células endoteliais (Lanuti et al. 2015) e VIC (Dai et al. 2019). Em nossos experimentos avaliamos a biocompatibilidade dos enxertos produzidos através do co-cultivo de fragmentos das cúspides com CTMs. Os dados obtidos revelam que ambos os enxertos são capazes de funcionar como um arcabouço para a adesão e proliferação de células-tronco. Porém, nos tecidos do grupo VPD-S observamos uma recelularização mais eficiente tanto em 7 quanto em 15 dias, sendo que nesse último período, a recelularização das cúspides do grupo VPD-S foi três vezes maior que a observada em VPD-B.

Além da repopulação, o remodelamento da MEC dos dois grupos mostrou-se possível, porém, compatível com os achados de recelularização, a síntese de colágeno ocorreu tardiamente em válvulas VPD-B. Considerando a importância das moléculas de matriz em influenciar o comportamento celular (Brizzi, Tarone, & Defilippi 2012; Fountoulaki & Dagres 2015), é provável que a recelularização e remodelamento menos eficiente observada em VPD-B estejam relacionados à redução da integridade da MEC causada pela descclularização. Concomitante a análise da recelularização por CTMs, fizemos a imunofluorescência para detecção de CD105. Nesse ensaio a marcação positiva para essa molécula foi vista predominantemente em células da periferia dos tecidos. Ao longo dos experimentos

o preparo dos tecidos recelularizados para imunomarcação apresentou-se um desafio. Devido ao tamanho diminuto dos arcabouços usados (3-4 mm²) as secções puderam ser realizadas até a espessura de 10 µm. Em tamanhos menores, os cortes se desprenderam facilmente da lâmina histológica. Desse modo, não ficou claro se a ausência de marcação para CD105 seria uma evidência de diferenciação celular ou uma possível limitação técnica relacionada à espessura do corte.

Como mencionado anteriormente, a recelularização de VCET com células valvares pode fornecer informações a respeito da integridade da MEC após a descelularização e prever o comportamento dessas células após o implante. Neste trabalho, isolamos e caracterizamos células migradas da válvula mitral de um doador humano, para então aplicá-las na recelularização dos arcabouços produzidos. Inicialmente, a caracterização imunofenotípica realizada nas passagens dois e sete revelou que as células isoladas expressaram predominantemente marcadores de fibroblastos e CTMs. Esses achados são compatíveis com o esperado para VIC, uma vez que essas células são consideradas fibroblastos que conservam o potencial de diferenciação das CTMs (Chen et al. 2009; Olsson, Rosenqvist, & Nilsson 1994). Parte da população caracterizada, cerca de 3%, expressou ainda o marcador de células endoteliais CD31. Esse não é um dado inesperado, uma vez que nenhum tratamento para a remoção da camada de VEC dos explantes foi realizado antes do cultivo, portanto, essa marcação pode indicar uma pequena contaminação por VEC nas culturas de células da válvula mitral. Nos mesmos ensaios verificamos que parte da população isolada era composta de fibroblastos cardíacos (células DDR2+). Sendo que a presença dessas células na cultura aumentou de acordo com as passagens, de 4% para 15% ao final do cultivo. Curiosamente, não há dados anteriores avaliando a presença de células DDR2-positivas em populações isoladas de válvulas cardíacas. Nesse sentido, novos experimentos deverão ser conduzidos para determinar se os fibroblastos cardíacos também podem estar presentes nas cúspides valvares humanas ou se esse dado trata-se apenas de uma contaminação da cultura de explantes de válvula mitral com fragmentos de miocárdio.

Estudos anteriores reportam que a expressão de alfa-SMA por VIC aumenta progressivamente de acordo com o número de passagens realizadas no cultivo celular (Latif et al. 2015; Pho et al. 2008). Entretanto, em nossos experimentos a expressão desse marcador manteve-se praticamente inalterada ao longo de sete passagens. Esse dado aparentemente discrepante pode ser explicado pelo fato de

que as células valvares isoladas neste trabalho foram cultivadas em meio MegaCell que, dentre outros fatores, contém FGF. Esse fator de crescimento é apontado como um dos reguladores negativos da transição da diferenciação espontânea de qVIC para aVIC, medida pelo aumento da expressão do alfa-SMA (Latif et al. 2015).

Este mesmo meio de cultivo foi utilizado para a realização dos ensaios de recelularização com VIC em arcabouços descelularizados. Nesses experimentos a colonização obtida com VIC foi parcial e semelhante nos dois grupos e, ao final do experimento, apenas uma pequena parte dessas células apresentou o fenótipo ativado (alfa-SMA+). Esse conjunto de dados sugere que o contato direto de VIC com as matrizes acelulares não foi suficiente para induzir a transição de qVIC para aVIC em um meio contendo FGF. Dado que aVIC tem maior capacidade proliferativa que qVIC (Rutkovskiy et al. 2017), é provável que se os arcabouços fossem capazes de induzir a transição para aVIC uma maior recelularização teria sido obtida ao final do ensaio. Em um estudo anterior, Hof e colaboradores (2016) realizaram o co-cultivo de VIC ovinas com cúspides descelularizadas, nesse ensaio os autores observaram apenas uma recelularização superficial ao final de sete dias. Além disso, outros achados também verificaram que CTMs e VIC são capazes de recelularizar cúspides porcinas, entretanto, tal como em nossos ensaios, a recelularização com CTMs foi mais eficiente (Roosens et al. 2017).

Em resumo, o conjunto de evidências do presente estudo demonstra que ambos os protocolos de descelularização resultaram em próteses não tóxicas, com quantidades reduzidas de DNA, compatíveis com células humanas e com potencial de remodelamento. Uma redução no conteúdo de GAG foi observada no grupo VPD-S, além de colágeno e elastina no grupo VPD-B. O protocolo combinado provou ser mais eficiente na remoção de DNA e fragmentos celulares, entretanto, os dados obtidos indicam que esses enxertos foram menos eficientemente recelularizados. Novos experimentos devem ser conduzidos a fim de determinar quantitativamente a perda de moléculas de matriz observada neste estudo, bem como, uma possível resposta imune induzida pelas próteses.

3 CAPÍTULO II

Artigo

Human Heart Explant-Derived Extracellular Vesicles: Characterization and Effects on the In Vitro Recellularization of Decellularized Heart Valves

Situação – Publicado na revista *International Journal of Molecular Sciences* (Março 2019)

Prefácio

Esse capítulo apresenta o artigo publicado na revista *International Journal of Molecular Sciences* que descreve o isolamento e caracterização de vesículas extracelulares derivadas de coração humano, bem como a análise do conteúdo proteico dessas vesículas e sua influência sobre a proliferação, adesão, migração e angiogênese de células-tronco mesenquimais e células endoteliais. O potencial das vesículas cardíacas em melhorar a recelularização de válvulas descelularizadas (VPD-S) também foi verificado.

Human Heart Explant-Derived Extracellular Vesicles: Characterization and Effects on the In Vitro Recellularization of Decellularized Heart Valves

doi:10.3390/ijms20061279

Amanda Leitolis¹, Paula Hansen Suss², João Gabriel Roderjan³, Addeli Bez Batti Angulski¹, Francisco Diniz Affonso da Costa², Marco Augusto Stimamiglio¹ and Alejandro Correa^{1*}

¹ Laboratory of Basic Biology of Stem Cells, Carlos Chagas Institute, Fiocruz-Paraná, Curitiba 81350-010, Brazil; aleitolis@gmail.com (A.L.); addeli.angulski@gmail.com (A.B.B.A.); marco.stimamiglio@fiocruz.br (M.A.S.)

² Pontifical Catholic University of Paraná—PUCPR, Curitiba 80215-901, Brazil; paula.h@pucpr.br (P.H.S.); costa.f@pucpr.br (F.D.A.d.C.)

³ Technological Federal University of Paraná—UTFPR, Curitiba 80230-901, Brazil; gabrielrdm@gmail.com

* Correspondence: alejandro.correa@fiocruz.br; Tel.: +55-41-3316-3231

3.1 ABSTRACT

Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are particles released from different cell types and represent key components of paracrine secretion. Accumulating evidence supports the beneficial effects of EVs for tissue regeneration. In this study, discarded human heart tissues were used to isolate human heart-derived extracellular vesicles (hH-EVs). We used nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM) to physically characterize hH-EVs and mass spectrometry (MS) to profile the protein content in these particles. The MS analysis identified a total of 1248 proteins. Gene ontology (GO) enrichment analysis in hH-EVs revealed the proteins involved in processes, such as the regulation of cell death and response to wounding. The potential of hH-EVs to induce proliferation, adhesion, angiogenesis and wound healing was investigated in vitro. Our findings demonstrate that hH-EVs have the potential to induce proliferation and angiogenesis in endothelial cells, improve wound healing and reduce mesenchymal stem-cell adhesion. Last, we showed that hH-EVs were able to significantly promote mesenchymal stem-cell recellularization of decellularized porcine heart valve leaflets. Altogether our data confirmed that hH-EVs modulate cellular processes, shedding light on the potential of these particles for tissue regeneration and for scaffold recellularization.

Keywords: human heart; tissue explant; extracellular vesicle; heart valve; tissue engineering; recellularization; cardiac regions; mesenchymal stromal cells

3.2 INTRODUCTION

A wide variety of cell types, such as cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle cells and cardiac resident stromal cells (CRSCs), such as fibroblasts and stem/progenitor cells, are found in the adult heart [1,2]. CRSCs have been isolated and characterized by the ex vivo culture of cardiac explants [3–5]. The conditioned media from cultured CRSCs exhibits cardioprotective and regenerative capabilities, being able to drive proliferation, cardiac differentiation and tube formation in endothelial cells [4]. Similarly, studies with cardiosphere-derived cells (CDCs) have also pointed out the beneficial effects on cardiac cells and heart function [6], CDCs lead to myocardial regeneration and functional improvement of the heart when

injected into infarcted mice [7]. A key component of paracrine secretion is the heterogeneous population of small membranous particles, called extracellular vesicles (EVs), which are released by cells. According to their size and origin, EVs can be classified into exosomes, endocytic origin and diameter of 30-100 nm; microvesicles, plasma membrane budding origin and diameter of up to 1000 nm; or apoptotic bodies, cell fragments of irregular form and variable size of up to 5 μ m [8]. EVs carry small bioactive molecules, such as lipids, DNA, RNA, miRNA and proteins [9]. Since they were first reported in 1964 [10], EVs have emerged as important components for intercellular communications under normal physiological and pathophysiological conditions [11,12].

Indeed, the potential use of EVs as therapeutic components has gained considerable interest, particularly for driving renal and cardiac repair [13–15]. However, there have been few studies on the regenerative properties of the vesicles derived from whole intact cardiac tissue obtained from explant of all cardiac regions. Recently, mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles were used to induce cell migration and vascularization into the acellular bone matrix [16]. Acellular matrices are scaffolds produced for tissue-engineering approaches such as the decellularization process. In this context, decellularized heart valves (DHV) are prostheses widely used to treat diseases that depend on valve replacement. However, cell repopulation into valvular scaffolds is limited and may result in implant degeneration [17]. Intensive efforts have been made to produce an ideal graft that has the capability to grow, repair, and remodel during the growth of the living recipient [18,19].

In the current study, human heart tissue discarded from a Brazilian valve bank was used to isolate human heart-derived extracellular vesicles (hH-EVs), which were characterized by nanoparticle tracking analysis (NTA) and proteomics. When assayed in vitro, hH-EVs have the potential to induce proliferation and angiogenesis in endothelial cells as well as stimulate “wound healing” and suppress the adhesion of human mesenchymal stromal/stem cells. Additionally, EVs could improve the recellularization of decellularized porcine heart valve leaflets with mesenchymal stem cells. Thus, hH-EVs have emerged as promising tools for scaffold functionalization and tissue regeneration.

3.3 RESULTS

3.3.1 Explant Characterization: Cells Derived from Different Heart Regions Are Similar and Heterogeneous

The immunophenotypically characterization of migrating cell populations from human heart explant cultures (derived from at least two different donors) was performed to identify different cell lineages from distinct regions of the heart: left ventricular myocardium (LVM), left ventricular endocardium (LVE), right ventricular myocardium (RVM), right ventricular endocardium (RVE), right auricle myocardium (AUM), right auricle endocardium (AUE) and mitral valve leaflet (MTL). Surface markers associated with fibroblasts and mesenchymal stem cells (CD90, CD105, CD73), endothelial cells (CD31), smooth muscle cells or pericytes (CD146, CD140b), cardiac progenitor cells (CD117) and cardiac fibroblasts (DDR-2) were analyzed (Table 1). Cardiac-derived cells migrated from all heart regions studied were strongly positive for CD105 and CD73, with the percentage of positive cells being approximately 66% in LVM cells and over 90% in the other heart regions. On the other hand, CD90 was consistently expressed in less than 60% of the cell populations. CD140b-positive cells were more common in the myocardial population (avg = 73%) than in the endocardium or mitral leaflet (avg = 28%). All cellular content analyzed revealed a small percentage of putative progenitor (5.09%–24.95%) and endothelial (0.96%–3.16%) cells. DDR-2-positive cells and cardiac fibroblasts were also observed ranging from 4.98% (LVM) to 30.95% (LVE). The lack or low percentages of some cell surface markers do not necessarily indicate that these cells are absent but, more likely, were not able to migrate or proliferate in the explant culture.

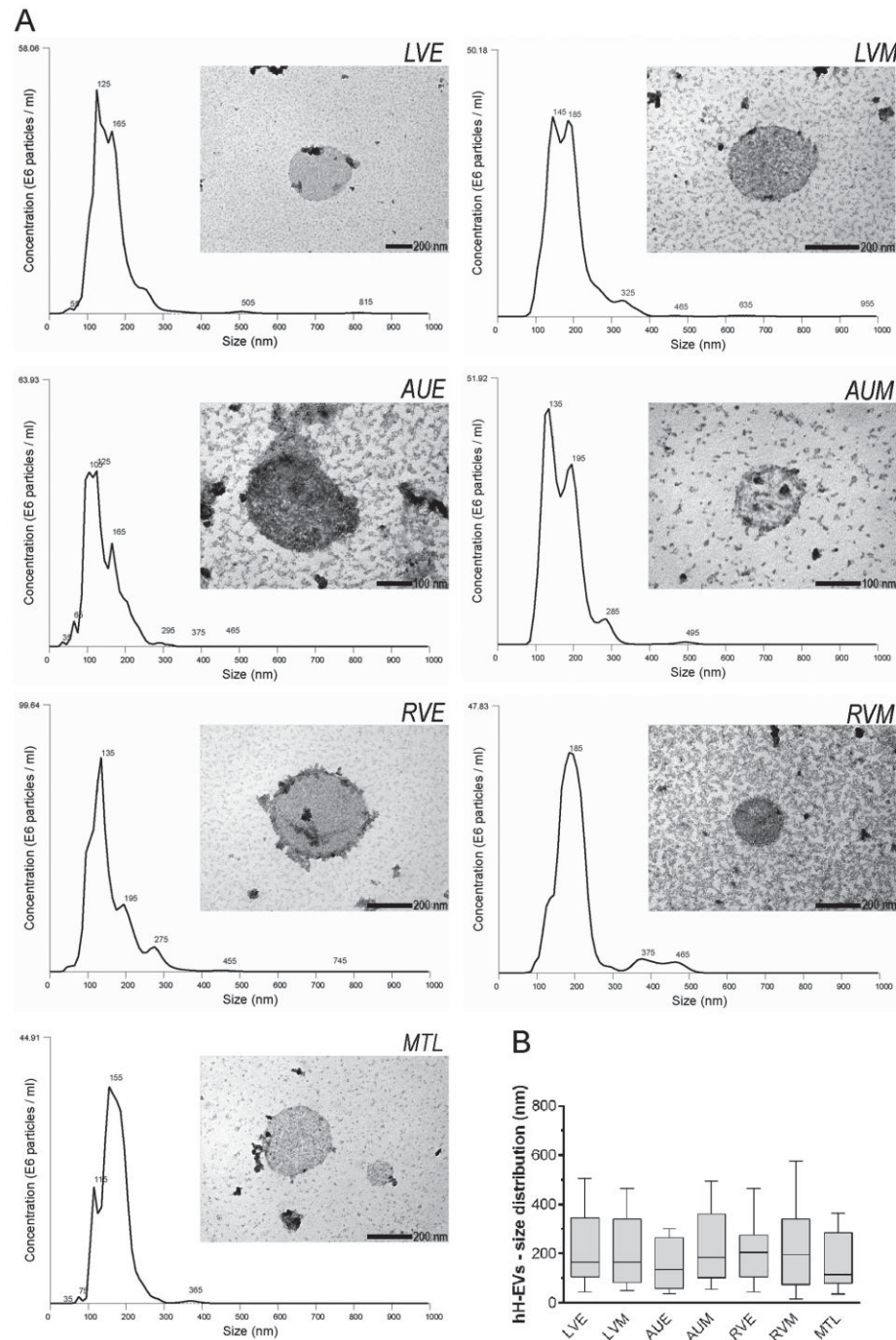
Paper hH-EVs Tabel 1. Explant characterization

	LVE	RVE	AUE	LVM	RVM	AUM	MTL
CD90	22 ± 8.3	17.15 ± 3.0	19.9 ± 6.0	27.1 ± 9.0	55.95 ± 4.5	31.2 ± 2.4	36.5 ± 20.4
CD105	92.05 ± 7.3	91.90 ± 7.4	84.65 ± 13.2	65.75 ± 17.0	94.75 ± 2.9	98.4 ± 0.2	98.65 ± 1.3
CD 73	97.7 ± 2.0	99.20 ± 0.3	91.15 ± 7.8	76.05 ± 23.4	95.4 ± 4.0	99.25 ± 0.5	97.6 ± 1.3
CD146	3.93 ± 3.5	1.25 ± 1.1	1.21 ± 0.6	0.91 ± 0.6	2.67 ± 0.8	1.35 ± 0.1	1.56 ± 0.2
CD140b	23.15 ± 10.5	32.80 ± 13.1	7.34 ± 1.0	53.60 ± 39.5	92.65 ± 1.1	67.05 ± 1.9	9.07 ± 1.9
CD117	6.20 ± 1.8	8.10 ± 2.3	11.4 ± 7.9	11.15 ± 1.1	24.95 ± 19.6	8.28 ± 3.6	5.09 ± 2.3
CD31	3.16 ± 1.4	2.13 ± 0.7	1.07 ± 0.4	1.71 ± 0.5	1.29 ± 0.3	0.96 ± 0.0	1.77 ± 0.1
DDR2	30.95 ± 24.4	22.65 ± 0.2	3.68 ± 2.3	4.98 ± 2.9	13.36 ± 13.4	17.15 ± 7.2	29.78 ± 22.5

3.3.2 Characterization and Prospective Functional Analysis of Human Heart-Derived Extracellular Vesicles (hH-EVs)

To evaluate the size and concentration of EVs extracted from cardiac explants, the samples from each donor were individually examined using NTA. NanoSight analysis showed that samples are formed by a heterogeneous population composed of particles of 30 nm to 400 nm (Figure 1A) with a very similar distribution (Figure 1B). Electron microscopy of EVs revealed the presence of spherical particles with double membranes and compatible sizes, as observed in NTA (Figure 1A).

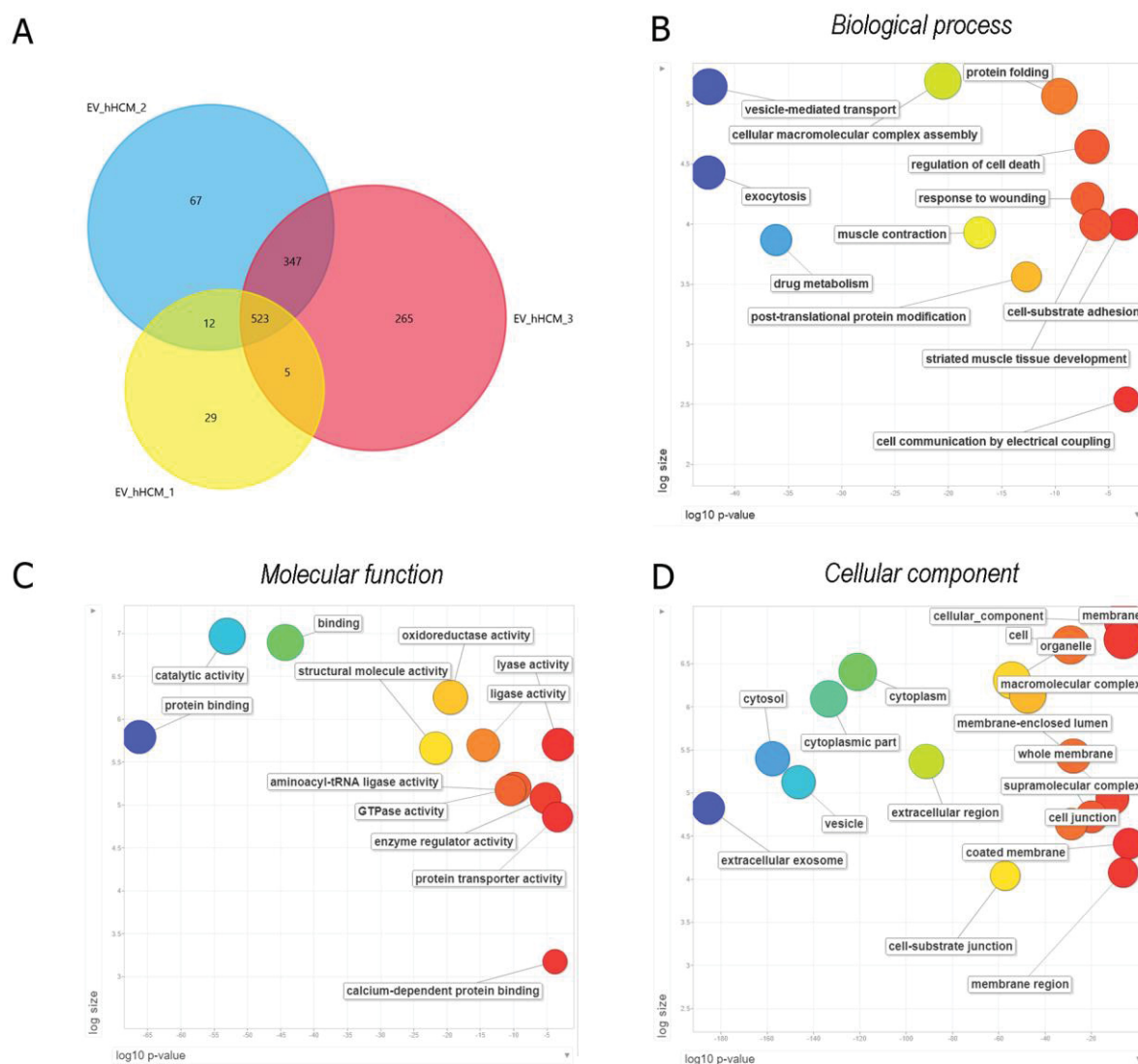
To better characterize and shed light on the putative functions of hH-EVs, a mass spectrometry (MS) analysis of the gel fractioned-EV proteins of three heart donors was performed. A proteomic analysis was carried out with no distinction among heart regions, and EVs were obtained from heart explants mixed in equal amounts. To increase the confidence level of the proteomic analyses, we only considered proteins that had a False Discovery Rate (FDR) value $\leq 1\%$ and were detected in at least two out of the three donors. The MS analysis identified a total of 1248 proteins, among which 523 were common to all three samples and 887 were detected in at least two samples (Figure 2A). Thus, the protein content was qualitatively similar among samples. The extracellular vesicle origin of the sample was indirectly tested by determining the percentage of proteins identified in our study that are included in the Vesiclepedia database (<http://www.microvesicles.org/index.html#>). Surprisingly, 93% of the 887 proteins identified here and used for further analyses, are part of the protein list in the Vesiclepedia dataset.



Paper hH-EVs Figure 1. Characterization of hH-EVs. (A) Representative graphics from nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM) images of extracellular vesicles derived from cardiac regions: left ventricular endocardium (LVE), left ventricular myocardium (LVM), right auricle endocardium (AUE), right auricle myocardium (AUM), right ventricular endocardium (RVE), right ventricular myocardium (RVM) and mitral valve leaflet (MTL). **(B)** Analysis of the size and distribution of samples individually examined using NTA.

The percentage of unique proteins in each sample was low, 5% for hHCM1, 7% for hHCM2 and 23% for hHCM3. Since our proteomic study is not saturating, the absence of a protein does not indicate that it is not present in the sample. To determine the putative function of the proteins identified in the hH-EVs, we conducted a gene ontology (GO) analysis with the proteins identified in at least two samples using g:Profiler (Table S1) software and summarized the results using Revigo. Among the most significant biological process terms related to exocytosis, vesicle-mediated transport, regulation of cell death, cell-substrate adhesion and response to wounding were identified (Figure 2B). Concerning molecular function, proteins involved in binding, GTPase activity, transporter activity and oxidoreductase activity were identified (Figure 2C).

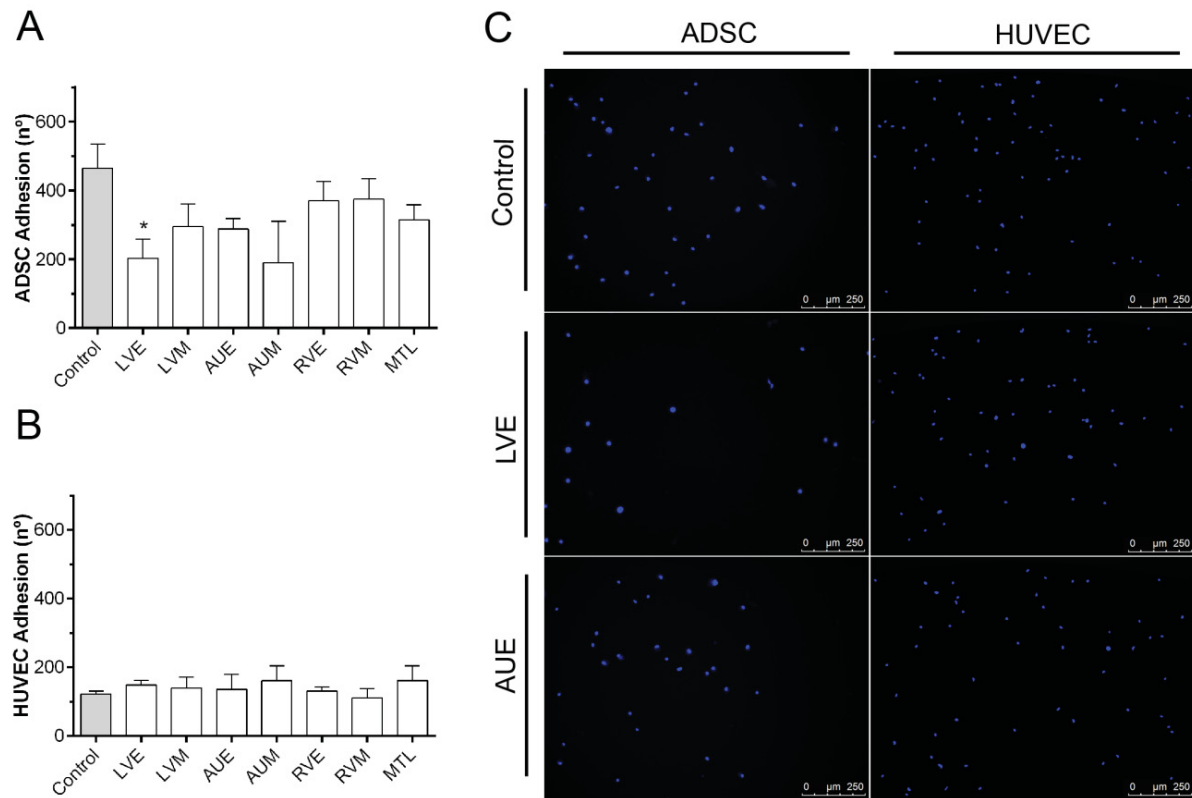
Finally, the proteomic analysis detected tetraspanins (CD81, CD9, CD63), heat-shock proteins (HSP-90) and other proteins enriched in exosomes. As a result, the major GO cellular component was extracellular exosome, followed by cytoplasm, vesicle and other terms such as coated membrane vesicles (Figure 2D). Altogether, these data suggest that our samples are highly enriched in EVs. Additionally, taking into account that the hH-EVs were obtained from discarded human heart material and that these vesicles exhibit a protein signature that might have interesting properties regarding tissue engineering and/or regenerative medicine, these possibilities are worth further study.



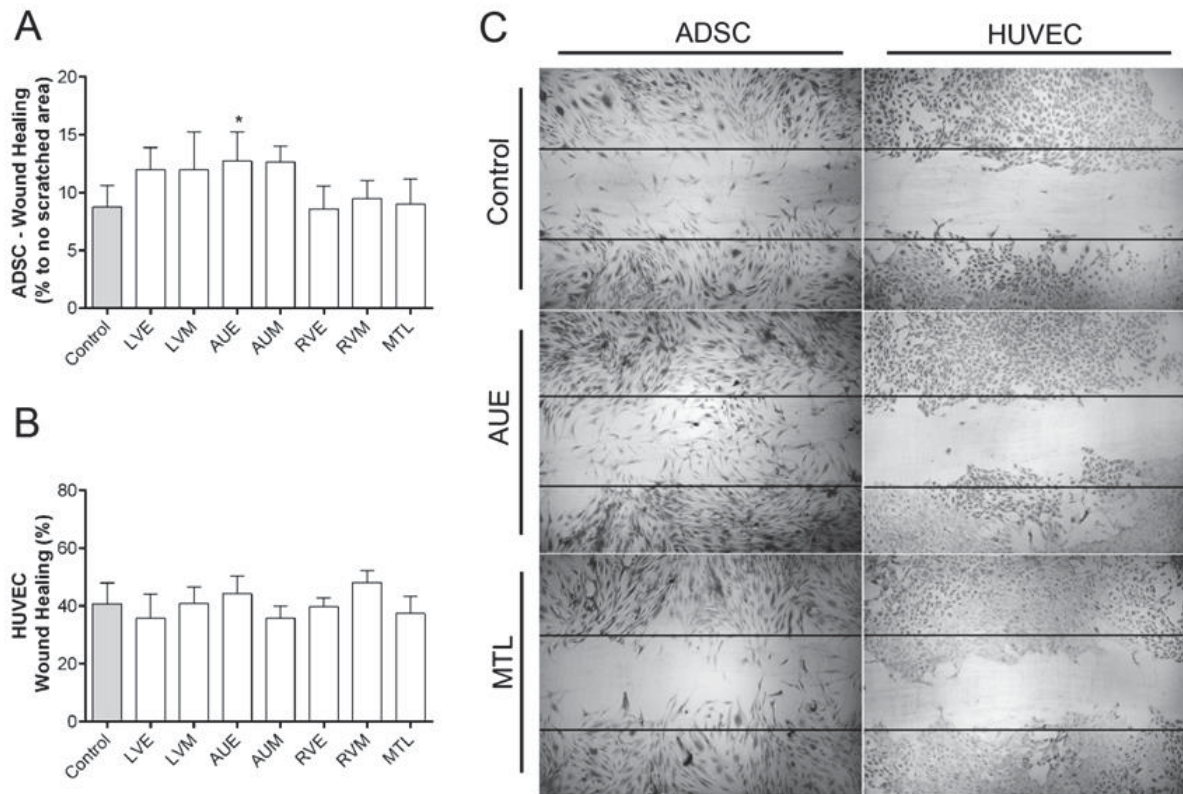
Paper hH-EVs Figure 2. Protein identification and functional enrichment analysis of human heart-derived extracellular vesicles (hH-EVs). (A) Venn diagram of the proteins identified in three different samples. The diagram shows an overlap of the proteins that were common between the samples analyzed. (B–D) Gene ontology enrichment analysis summarized and visualized as a scatter plot using Revigo. The GO terms were ordered in relation to the p-value (x-axis) obtained from the GO term enrichment analysis and the frequency of GO terms in the Gene Ontology Annotation Database (y-axis). The Venn diagram was generated using Funrich software, and the GO analysis was conducted with g:Profiler software.

3.3.3 hH-EVs stimulate directional cell migration and decrease the adhesion capabilities of ADSCs

To determine whether hH-EVs could influence the adhesion of HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells - Lonza Clonetics®, USA) and ADSCs (Human Adipose Derived Stem-Cells - Lonza Clonetics®, USA), we evaluated the number of cells adhered using high-content imaging system, and the cell adhesion period was established after standardization (Supplementary Figure 1). The results obtained with ADSCs showed an overall adhesion reduction induced by hH-EVs, but this reduction was significant only for LVE (Figure 3A). On the other hand, we did not observe any statistically significant difference in the number of attached HUVECs between the control groups (medium FBS-deprived) and the hH-EV groups (Figure 3B). Similarly, we also evaluated the migration capacity of ADSCs and HUVECs influenced by hH-EVs. When the assay was performed with ADSCs, the amount of cells in the wound area after 24 h was significantly augmented with the addition of AUE-derived vesicles to the medium (Figure 4A and C). This assay did not reveal any significant differences in HUVEC migration capabilities induced by cardiac EVs (Figure 4B and C).



Paper hH-EVs Figure 3. Influence of hH-EVs derived from cardiac regions on human adipose-derived stem cell (ADSC) and human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) adhesion. Quantification of adhered (A) ADSCs and (B) HUVECs stimulated by hH-EVs. (C) Representative images of adhered cells after 20 min of treatment with extracellular vesicles derived from the left ventricular endocardium (LVE) and control without vesicles. Scale bar = 500 μ m. * $p < 0.05$.

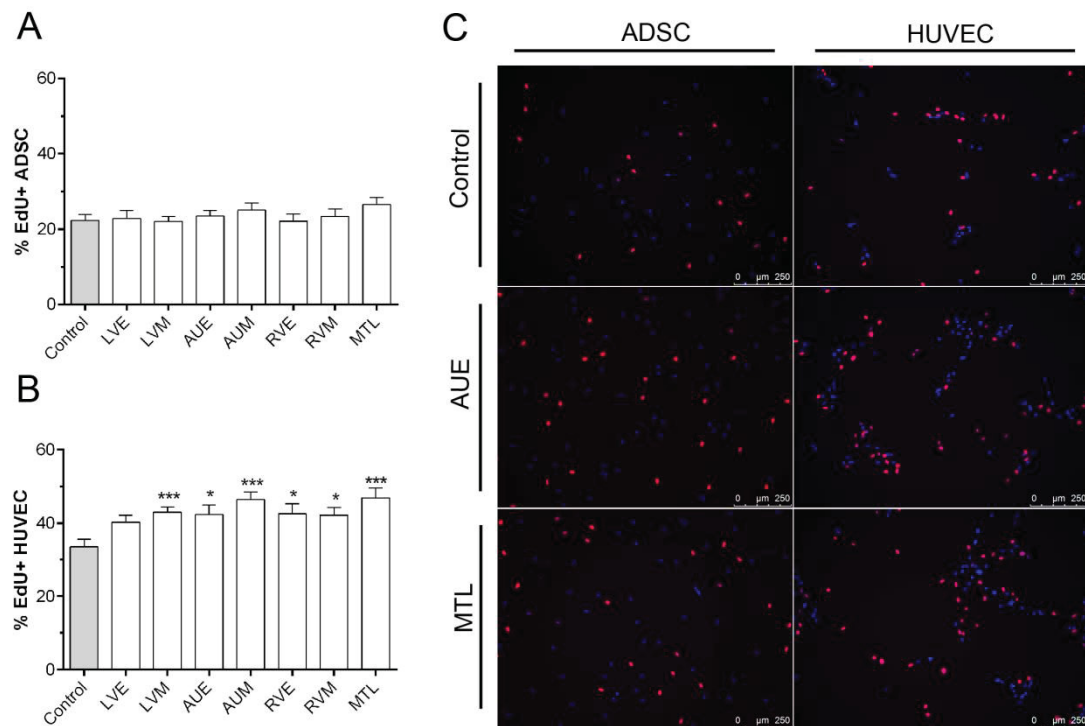


Paper hH-EVs Figure 4. Influence of hH-EVs derived from cardiac regions on ADSC and HUVEC wound healing. Quantitative analysis of the percentage of ADSCs in the scratched area after 24 h. **(B)** Percentage of wound closure by HUVECs after 24 h. **(C)** Representative images of wound healing stimulated by extracellular vesicles derived from the left ventricular endocardium (LVE) and the right auricle endocardium (AUM). Horizontal lines represent the initial scratched area (0 h), 4X magnification. * $p < 0,05$.

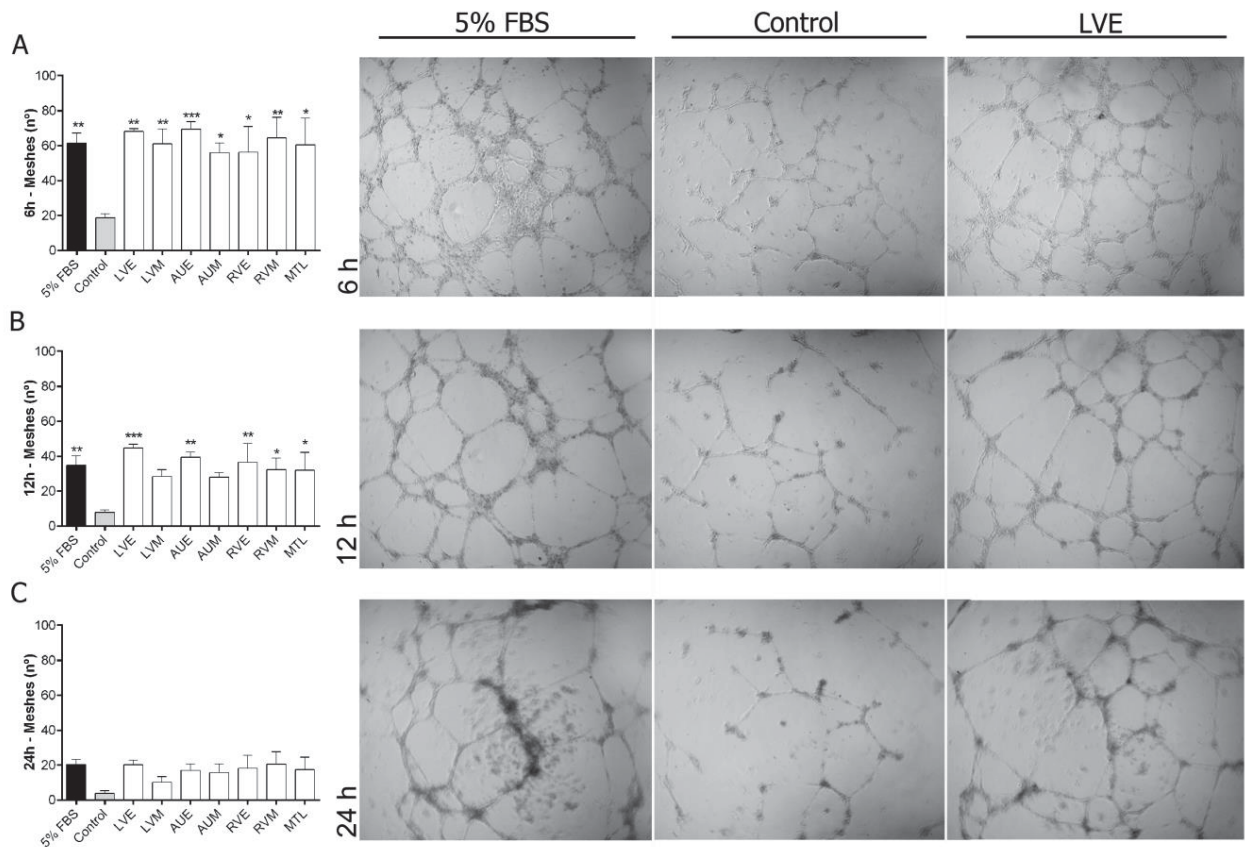
3.3.4 hH-EVs stimulate proliferation and the in vitro angiogenesis of HUVECs

To evaluate the proliferation-promoting activity of hH-EVs, an assay was performed using EdU, a thymidine analog that was incorporated into the cells during 24 h under EV stimulation. The results obtained showed that hH-EVs were not able to induce mesenchymal stem-cell proliferation (Figure 5A and C). On the other hand, all samples of EVs significantly induced the cell proliferation of HUVECs in vitro, except for the LVE sample (Figure 5B and C). Considering the endothelial cell proliferation induced by hH-EVs, we performed an in vitro assay to verify the angiogenic potential of cardiac EVs on HUVECs. Our results showed that hH-EVs derived from all heart regions were able to significantly induce tube-like structures after 6 h of culture on the Matrigel layer compared with the control medium without hH-EVs (Figure 6A). Surprisingly, the in vitro angiogenic effects reached levels and

quality consistent with the gold standard control (5% FBS). During the time course of the experiment, tube-like structures decreased. However, after 12 h, the number of meshes induced by LVE, AUE, RVE, RVM and MTL extracellular vesicles was significantly higher than the control (Figure 6B). Although after 24 h, the number of capillary-like networks stimulated by hH-EVs remained higher than that stimulated by the control, and the differences were not statistically significant (Figure 6C).



Paper hH-EVs Figure 5. Influence of hH-EVs derived from cardiac regions on ADSC and HUVEC proliferation. Analysis of the percentage of EdU+ **(A)** ADSCs and **(B)** HUVECs cells after 24 h. **(C)** Representative images of EdU+ cells (red) stimulated by extracellular vesicles derived from right auricle endocardium (AUE) and mitral valve leaflet (MTL). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

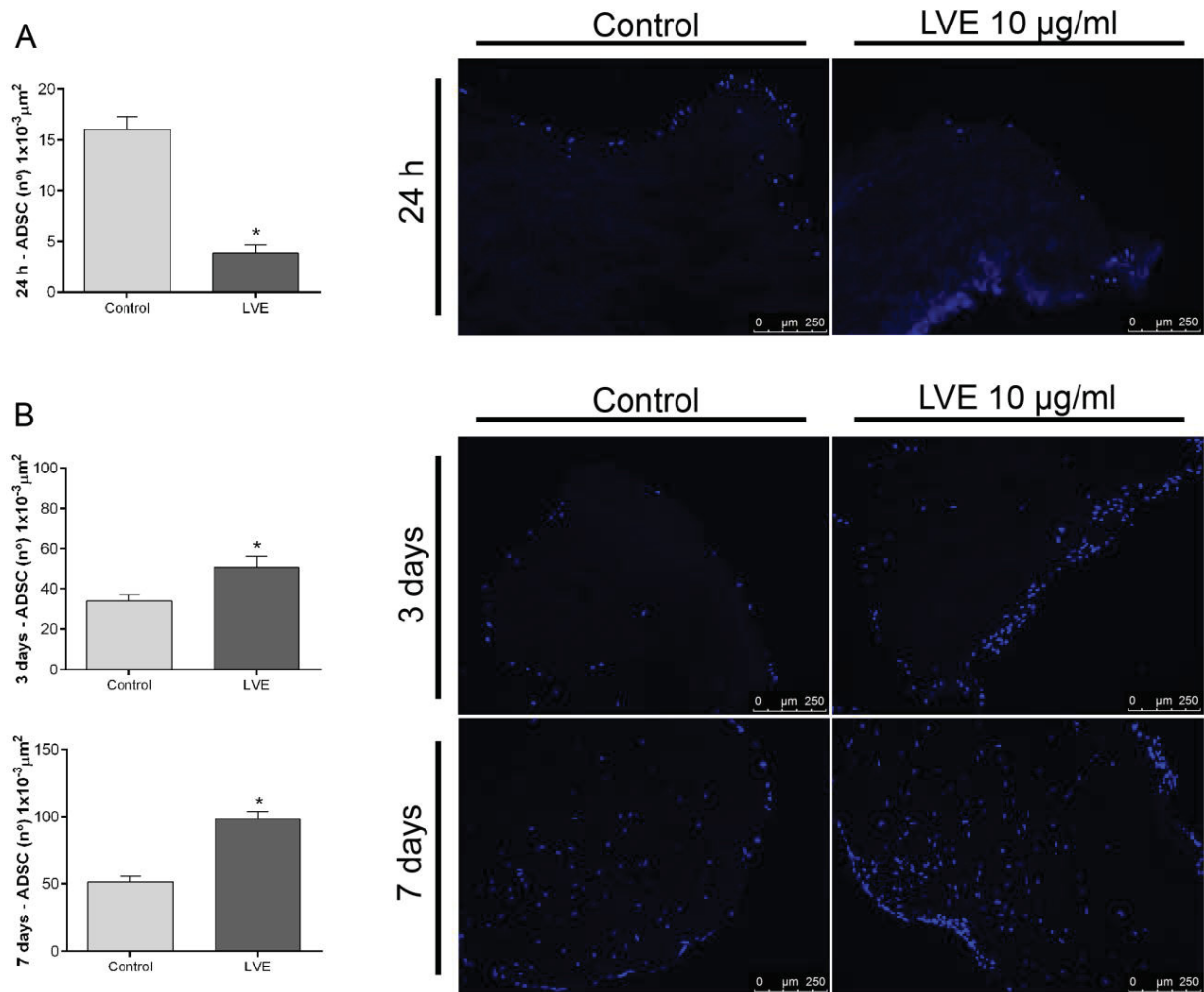


Paper hH-EVs Figure 6. In vitro angiogenesis assay of HUVECs cultured for 24 h on a Matrigel layer under the influence of hH-EVs derived from cardiac regions. Representative images and analysis of the number of meshes formed after 6 h (A), 12 h (B) and 24 h (C). *p <0,05 vs Control; **p <0,01 vs Control; ***p <0,001 vs Control.

3.3.5 Effect of LVE-EVs on leaflet scaffold recellularization

Before the valve scaffold recellularization experiments, we confirmed whether the leaflets were satisfactorily decellularized through the optical evaluation of nuclei presence/absence by using bright field and fluorescence microscopy (Supplementary Figure 2). No nuclei were observed in any of the leaflet scaffolds used in our study. When ADSCs were cultured under standard conditions, after 24 h of cell-scaffold interactions, a layer of cells was found attached to the scaffold surface. However, when scaffolds were previously functionalized with LVE-EVs, a significant reduction in the number of cells adhered to the scaffold surface was observed (Figure 7A; Supplementary Figure 3). Considering the observed effects of hH-EVs on ADSC migration on plastic plates (Figure 4), we wondered whether hH-EVs could potentiate ADSCs to colonize the decellularized scaffolds once these cells had become

adhered. To this end, unfunctionalized scaffolds were transferred to a low-binding plate and cultured with 10 $\mu\text{g/ml}$ of LVE-EVs. Interestingly, after 3 and 7 days of culture, the ADSCs under EV stimulation were able to colonize the leaflet scaffolds more efficiently than the ADSCs under control conditions (Figure 7B; Supplementary Figure 3).



Paper hH-EVs Figure 7. Extracellular vesicles derived from LVE affect scaffold recellularization.

(A) Representative images and analysis of the number of cells/area of fragments previously coated with 10 $\mu\text{g/ml}$ LVE-EVs and cultivated with ADSCs for 24 h. (B) Representative images and analysis of the number of cells/area of fragments cultivated with ADSCs for 24 h and then stimulated with 10 $\mu\text{g/ml}$ LVE-EVs. The fragments were cultivated for 3 and 7 days. Unpaired t test * $p < 0.05$.

3.4 DISCUSSION

In the present study we used human cardiac tissues explanted from cadaveric donors to isolate EVs. This material, which would be discarded, can be an interesting tool for understanding paracrine signaling in the heart and examining a putative agent in cell-free therapy approaches. Whereas the majority of studies involving cardiac-derived EVs were performed with isolated cells, we focused on the study of EVs derived from heart fragments that contain a complex network of cells.

The human heart comprises of four distinct chambers (two atria and two ventricles) arranged in three layers: pericardium, myocardium and endocardium [20]. A number of animal and human studies have been conducted to estimate the abundance of cardiac resident cells [2], [21], [22]. Currently, the most abundant cell types in mammalian hearts are cardiomyocytes (25-35%) [21], fibroblasts (< 20%) and endothelial cells, which were recently identified as the most frequent cell type in mice hearts (60%) [2]. In previous studies, we demonstrated that CRSCs isolated by explant tissue culture consist of a heterogeneous population with the characteristics and differentiation potential of mesenchymal stem cells (MSCs) [4]. Here, we separated the heart layers and chambers to obtain explant characterizations for each cardiac region. Phenotypic profiling indicated that the cells that migrated from explants are a heterogeneous population that was mostly similar between the cardiac regions studied. The majority of cells were strongly positive for fibroblasts and mesenchymal stem cells and few cells were positive for endothelial and progenitor markers. This findings is in accordance with studies that isolate cardiac cells for cardiospheres culture and expansion [23]. Additionally, CD140b-positive cells seemed to be more abundant in the outgrown population of myocardium than endocardium samples. It is important to reinforce that the immunophenotypic characterization was performed on the migrating cell population from the human heart explants and not necessarily reflects the cell content of these explants.

Currently, many efforts have been directed towards the study of cardiac-derived extracellular vesicles. Previous studies have been characterized the particles released by cardiomyocytes [24], [25], cardiac-derived progenitor cells [26], [27] and also cardiac cells derived from induced pluripotent stem cells (iPS) [28]. In the present study, for the first time, the EVs released from explanted human cardiac tissue were isolated. The EV population evaluated was derived from the pool of cell

types present in each cardiac explanted tissue region, not from isolated cardiac cells. Nanoparticle tracking analysis and transmission electron microscopy collectively revealed that the purified hH-EVs are a heterogeneous population with a wide size range suggesting the presence of both exosomal and non-exosomal EVs. Furthermore, the hH-EVs showed similar sizes and distributions between cardiac samples. The mechanical disruption to obtain the explant and the culture might produce cellular debris and apoptotic bodies; however, most of them would be filtered out during our experiment. Thus, we believed that our hH-EVs preparations contain little to no contamination.

To further study the putative functions of the hH-EVs, a proteomic analysis was performed. We identified a total of 1248 proteins of which 887 were shared between at least two samples. Not surprisingly, the functional enrichment analysis revealed that most of the proteins were related to exosomes and vesicles. Consistently, major biological process GO terms were associated with exocytosis and vesicle-mediated transport. In addition, terms such as regulation of cell death, cell-substrate adhesion and response to wounding were found and may help to explain some effects observed in functional experiments. In fact, in assays conducted with stem cells, the AUE-derived EVs promote significant augmentation in ADSC “wound healing”, also, the cell migration appeared to be facilitated, although not significantly, by LVE and LVM EV samples. These results are consistent with previous findings in which cardiac progenitor cell (CPC)-derived EVs reduce scarring after the induction of myocardial infarction in rats [26]. Furthermore, some proteins involved in cell migration, such as CD47 [29], ITGA1 [30] and ILK [31] were identified in hH-EVs through mass spectrometry analysis (Table S1). On the other hand, an overall adhesion reduction was observed in cultures of ADSCs supplemented with hH-EVs; however, the significant impairment in ADSC adhesion was only observed with EVs from LVE samples.

The effect of hH-EVs in reducing ADSC adhesion was an unexpected finding since the proteomic analysis revealed several cell-adhesion related proteins in hH-EVs as integrins and cadherins, among others (ITGA1, ITGA5, ITGB1, ILK, VTN, CDH13 and CTNNA1). However, it was recently demonstrated that endothelial-derived EVs can attenuate monocyte adhesion to HUVECs by negative regulation of adhesion proteins expression [32]. As previously shown [33], this effect was related

to the microRNA (miR)-222 transference. Thus, further analysis like hH-EVs RNA sequencing would be necessary to elucidate this apparently controversial result.

In contrast, the hH-EVs did not affect the adhesion and wound healing capabilities of endothelial cells. However, after 24 h of treatment, hH-EVs induced significant HUVEC proliferation compared to control. Additionally, a time course experiment was performed to determine the hH-EV potential to induce tube-like structures. The angiogenic potential was notorious in all EVs samples, and the quality of tube structures was observed to be similar to the gold standard condition. Interestingly, hH-EVs isolated from the endocardium appeared to be more efficient in sustaining tube-like structures. Previous studies have demonstrated that exosomes released by H9C2 cardiomyoblasts were able to induce proliferation and stimulate angiogenesis in HUVECs [34]. Indeed, angiogenesis appears to be modulated by EVs derived from different cell types, depending on the EV content and surface molecule expression [35]. Although we did not find any GO terms associated with angiogenesis, the protein $\beta 1$ integrin was identified in hH-EVs (Table S1). This molecule was previously reported as a mediator of the proangiogenic effect caused by HUVEC-derived EVs [36]. In addition, other mechanisms are involved in angiogenesis induced by EVs, such as microRNAs and lipid transference [35] which could not be evaluated in this study. It is also worth to mention that studying the effects of hH-EVs on ADSC and HUVEC not necessarily represent the precise physiological targets of hH-EVs

These findings prompted us to verify a putative application for hH-EVs. Tissue engineering is constantly innovating to produce scaffolds for many applications [37]–[39]. A technique widely under investigation is cell-free scaffold production. In this study, we used a previously standardized methodology [40], [41] to generate decellularized porcine heart valves. Subsequently, the leaflets were removed and repopulated with ADSCs. Although DHVs show promising results for valve replacement, the clinical application of these scaffolds remains a challenge because of the limited cell repopulation into the decellularized natural matrix [17]. One strategy to facilitate cell recruitment into the DHV is the use of bioactive molecules [42]–[44]. Complete recellularization of the acellular scaffold is highly desirable because it can modulate the host response to transplanted tissue [45] and inhibit tissue calcification [46]. In our experiments, LVE-EVs were used as bioactive molecules in ADSC repopulation. In fact, the LVE-EVs significantly reduced stem cells adhesion to the

valve matrix, corroborating the results of functional assays. However, when LVE-EVs were used to stimulate ADSC repopulation after cell adhesion on the leaflet surface, a significant increase in recellularization was observed, probably by allowing a higher rate of cell interiorization into the leaflet scaffolds. Unfortunately, because of the limited availability of hH-EVs, we could not test all samples in scaffold repopulation or diversify the concentrations tested. Therefore, some issues remain to be addressed. For instance, the proangiogenic potential of hH-EVs can be interesting to promote the formation of vascular structures, which is critical for many tissue engineering strategies.

In conclusion, we have demonstrated that hH-EVs comprise both exosomal and non-exosomal particles that contain a set of proteins advantageous for tissue regeneration approaches. In this study we use a post-fabrication approach to improve the functionality of DHV through the delivery of a biological agent (hH-EVs) obtained from a material discharged of the preparation of human heart valves. hH-EVs were able to modulate proliferation, wound healing, adhesion and angiogenesis differently depending on the cell type. The beneficial effects of hH-EVs have shed light on the regenerative properties of these particles and their applicability for scaffold modification.

3.5 MATERIALS AND METHODS

3.5.1 Ethics Statements

The cardiac tissues used in this study were harvested from 8 human cadaveric donors at the Human Tissue Bank (PUCPR, Paraná, Brazil). The tissues were found to be unsuitable for therapeutic use and were discarded after heart valve dissection. According to the current Brazilian legislation (Ordinance nº 2048, Section XI of transplants, Clause 478), this material was approved for scientific research purposes. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. For experiments using porcine heart valves, the tissues were obtained from a local slaughterhouse (FrigoKeller LTDA—Paraná, Brazil). All procedures were performed after approval by the Human and Animal Ethics Committees of Pontifical Catholic University of Paraná (approval number 1.455.773).

3.5.2 The Culture and Characterization of the Explants

For tissue explant cultures, human cardiac fragments of the right auricle, right ventricle, left ventricle and mitral valve leaflet were obtained from cadaveric donors. Initially, the endocardial tissue was released from the myocardium of auricle and ventricle fragments. Next, the specimens were processed separately in samples from the left ventricular myocardium and endocardium (LVM, LVE), the right ventricular myocardium and endocardium (RVM, RVE), the right auricle myocardium and endocardium (AUM, AUE) and the mitral valve leaflet (MTL).

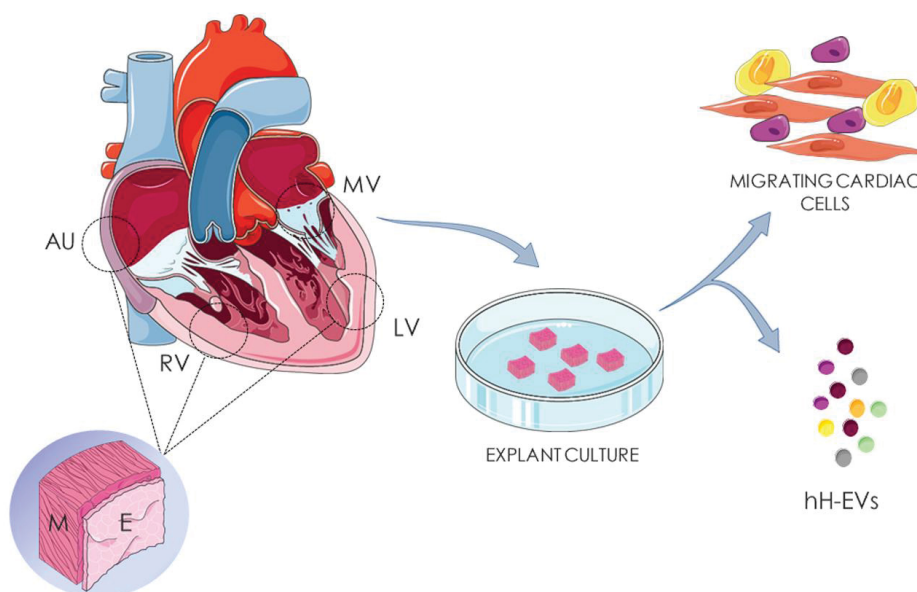
After separation, the tissues were manually minced into 1–2 mm³ fragments as previously described [3]. Briefly, the explants were adhered to flasks coated with collagen film (Sigma, Ronkonkoma, NY, USA) and cultured in rich medium to allow growth of a wide variety of cell types. MegaCell™ (Sigma, USA) medium was supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco™ Invitrogen Corporation, Big Cabin, OK, USA), 2 mM L-glutamine (Gibco™ Invitrogen Corporation, USA), 5 ng/mL basic fibroblast growth factor, 0.1 mM β-mercaptoethanol, 1% nonessential amino acids, 100 IU/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin (Sigma, USA), at 37 °C and 5% CO₂. Then, cells that migrated from the fragments were dissociated using 0.25% trypsin-EDTA and replated at a density of 0.2–0.5 x 10⁴ cells/cm².

To characterize the explants obtained from different heart regions, migrated and cultured cells at passages 2–3 were immunophenotypically characterized by flow cytometry with fluorochrome-conjugated antibodies against the following human proteins: CD90 (1:20), CD105, CD73, CD31 (1:50), CD117 (1:20) (eBioscience, San Diego, CA, USA), CD140b, CD146 (1:50) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and DDR-2 (1:50, Abcam, Cambridge, UK). Mouse isotype IgG1 antibodies for each fluorochrome were used as controls (BD Biosciences). The data were acquired with a FACSCanto II flowcytometer (BD Biosciences) and analyzed by FlowJo software version 10.0.8r1 (<http://www.flowjo.com/>).

3.5.3 Isolation of Heart-Derived Extracellular Vesicles

To isolate human heart-derived extracellular vesicles (hH-EVs) the tissues were processed as described for the explant characterization (Section 4.2) (Figure 8); however, after dissociation, the heart fragments were cultured at 37 °C and 5%

CO₂ in 5 mL of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum depleted of vesicles (dFBS). The dFBS was obtained from the supernatant of FBS ultracentrifuged under the same conditions used for the isolation of vesicles to avoid cross-contamination (Supplementary Figure S4).



Paper hH-EVs Figure 8. Isolation of heart-derived extracellular vesicles. Human cardiac fragments of right auricle (AU), right ventricle (RV), left ventricle (LV) and mitral valve (MV) were obtained from cadaveric donors. Endocardial (E) and myocardial (M) tissues of AU, RV, LV were separated before culture. The samples were dissociated in fragments of 3 mm² and culture for human heart-derived extracellular vesicles (hH-EVs) and cardiac cells isolation.

After 24 h of cardiac tissue incubation, the culture supernatants were collected, filtered on a 40 µm porosity cell strainer and centrifuged two times at 700 xg for 5 min and 4.000 xg for 20 min followed by 0.22 µm membrane filtration. The supernatants were ultracentrifuged for 1 h and 20 min at 100.000 xg and the pellets were resuspended in PBS and stored at 4°C. This procedure of supernatant collection/storage at 4°C was followed by culture medium (supplemented with dFBS) replacement to ensure three consecutive isolations of hH-EVs. After the third day of EV collection, all obtained samples were submitted to ultracentrifugation at 100.000 xg for 2 h. Finally, the purified hH-EVs were resuspended in small volumes of PBS and the protein concentration of the samples was determined using a Qubit® fluorometer (Life Technologies™, Invitrogen, NY, USA). The hH-EV samples were stored at -80 °C until further used.

Equal amounts of the isolated hH-EV samples derived from at least 3 donors were mixed into pools according to the seven heart tissue regions evaluated (LVM, LVE, RVM, RVE, AUM, AUE, MTL; Table 2). The pools were concentrated by centrifugal filters (Amicon® Ultra – 0.5 ml 30 K, Millipore, Ireland) at 0.5 µg/µl and used to evaluate their effects on cell adhesion, proliferation, migration and angiogenesis.

Paper hH-EVs Tabel 2 Clinical information about the heart donors and the hH-EV pool construction.

Subject	Gender	Age	Weight	Race	LVM	LVE	RVM	RVE	AUM	AUE	MTL
A	M	48	67	White		+	+		+		+
C	M	51	80	Black	+	+	+	+	+	+	
D	F	50	60	Black		+			+	+	+
E	M	19	60	Mix of Races	+			+		+	
F	M	42	115	White				+		+	+
G	F	56	56	Mix of Races	+		+		+		

3.5.4 hH-EV characterization by Nano Tracking Analysis, Transmission Electron Microscopy and Mass spectrometry analysis.

The physical characterization of hH-EVs was conducted using NTA and Transmission Electron Microscopy (TEM). To record data on hH-EV concentration and size, samples derived from each cardiac region were diluted 20-fold in PBS and analyzed using NanoSight LM10 (NanoSight Ltd., UK) and NTA 3.6 analytic software. The TEM analysis was performed by loading 15 µg of hH-EVs onto 300-mesh nickel/formvar-coated grids (Electron Microscopy Science, Washington, USA) for 1 h. After that, the grids were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science) and postfixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) plus 0.1 M cacodylate for 10 min each. The grids with hH-EVs were washed with ultra-pure water and stained for contrasts using 2% uranyl acetate for 10 min. The grids containing samples were analyzed on a transmission JEOL JEM-1200 EX II electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) (Electron Microscopy facility, Instituto Carlos Chagas) operating at an acceleration voltage of 80 kV.

To disclose the general protein composition present in the hH-EVs, explants from myocardial auricle and ventricle regions were cultured at a ratio of 1:1 under the

same conditions as described above. Samples from three different donors were obtained. The hH-EV isolation was conducted as described in section 2.3. Then, the proteomic analysis was carried out with 30 µg of hH-EVs per donor as previously described by our group [47].

3.5.5 ADSC and HUVEC cultures

For the assessment of hH-EVs function in cell signaling *in vitro*, two different cell lineages were used: ADSCs maintained in DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin and 10% FBS, and HUVECs cultured in Endothelial Cell Growth Medium (EBM-2) supplemented with hydrocortisone, hFGF, VEGF, IGF, ascorbic acid, hEGF, 30 mg/mL gentamicin and 15 µg/mL amphotericin. All cell cultures for the different *in vitro* assays were maintained at 37°C and 5% CO₂.

3.5.6 Cell proliferation assay

To evaluate the potential of hH-EVs to induce ADSC and HUVEC proliferation, the cells were seeded at 5×10^3 cells/well, onto 96-well plates in 50 µl of DMEM or EBM-2 deprived of FBS. After 24 h, the medium was removed, and 10 µg/ml hH-EVs and 5 µM EdU diluted in 50 µl of medium deprived of FBS were added to the wells for 24 h. EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) incorporation into DNA synthesized over 24 h was detected with the Click-iT® EdU Alexa Fluor® 594 Imaging Kit (Thermo Fischer, USA), according to the manufacturer's instructions. In order to quantify the cell proliferation, 3 pictures of each well (10X magnification) were recorded using DMI6000B microscope (Leyca Microsystems, Wetzlar, Germany), and the percentage of cells positively labeled for EdU was analyzed by NIH ImageJ software v. 1.45s (National Institute of Health, USA). Before the cell proliferation, adhesion, scratch-wound and *in vitro* angiogenesis experiments, the cells were synchronized by 24-hour serum starvation. Control conditions were evaluated using medium deprived of FBS.

3.5.7 Cell adhesion assay

To evaluate whether hH-EVs could affect cellular adhesion, suspensions containing 5×10^3 cells plus 10 µg/ml hH-EVs were plated onto 96-well plates and

incubated for 20 min at 37°C and 5% CO₂. Immediately thereafter, the plates were subjected to 100 rpm agitation to promote nonadherent cell removal. The remaining cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.05 µl/mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). The quantification of the adhered cells was performed by an Operetta HTS imaging system (PerkinElmer, Waltham MA, USA) at 10X magnification with 9 fields of view.

3.5.8 Scratch wound-assay

The effect of hH-EVs on ADSC and HUVEC migration was measured by scratch wound assay. The cells were cultured in 96-well plates until confluence. Subsequently, a single scratch was created on the monolayer using a p200 micropipette tip. Next, the cells were washed two times with BSS-CMF and then 50 µl of medium containing 10 µg/ml hH-EVs was dispensed above the cultures. After 24 h, the cells were stained with crystal violet. For HUVECs, the percentage of wound closure Scratch wound-assay was calculated by comparing the scratched area at 24 h with the initial scratched area (0 h). On the other hand, because the ADSCs spread throughout the scratch area, it was difficult to quantify the area that remained opened after migration. Thus, wound closure was calculated by comparing the number of cells at and out of the scratched area (100% closure) at 0 h and after 24 h. Quantitative analysis was performed with pictures (4X magnification) acquired using GmbH 37081 microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Gottingen, Germany) and analyzed with NIH ImageJ software v. 1.45s (National Institute of Health, USA).

3.5.9 In vitro angiogenesis assay

To evaluate the potential of hH-EVs to generate tubule-like structures *in vitro*, 2x10⁴ HUVECs were plated in the wells of Matrigel®-coated 96-well plates (Matrix Basement Membrane, New York, USA). The cells were cultured in 50 µl of EBM medium deprived of FBS and supplemented with 10 µg/ml of hH-EVs. The progress of capillary-like formation was recorded using GmbH 37081 microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Gottingen, Germany). Each well was photographed (4X magnification) to register the entire network at 6, 12 and 24 h after plating. The number of meshes was quantified manually.

3.5.10 Decellularization of porcine heart valves

Three porcine hearts (*Sus domesticus*) were obtained from a slaughterhouse, decontaminated in antibiotic solution (RPML, streptomycin 1 mg/ml, penicillin 1 mg/ml, amphotericin 1 mg/ml) at 4°C for 24 h and used for pulmonary valve dissection. The isolated valves were decellularized using 0.1% SDS and 0.02% EDTA solution for 24 h, as described previously (Costa et al. 2007a). To confirm the decellularization process, the valve leaflets were removed, fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and stained with 0.05 µl/mL DAPI or H&E (Hematoxylin-Eosin).

3.5.11 In vitro porcine valve leaflet scaffold recellularization

Decellularized leaflets were cut into 3 mm² fragments. To investigate the effects of hH-EVs on cell adhesion to the scaffold, EVs isolated from the left ventricular endocardium (LVE-EVs) were used. First, the fragments were coated with 30 µl of DMEM containing 10 µg/ml of LVE-EVs. Then, the scaffolds were maintained in hanging drop plates (Nunc™ Δ Surface, NUNC, Denmark) for 2 h at 37°C. Then, the plates were inverted and incubated for additional 2 h under the same conditions. This step was established to allow the interaction between LVE-EVs and the scaffolds. Next, the functionalized leaflet scaffolds were incubated with 30 µl of 5x10⁴ ADSC at 37°C and 5% CO₂. The 3D cultures were maintained in hanging drop plates for 24 h and then processed to measure cell adhesion as described below.

To predict the effects of LVE-EVs after ADSC adhesion, we conducted an experiment with unfunctionalized leaflet scaffolds. The fragments were prepared as described previously (30 µl of DMEM, 37°C, 4 h) but without LVE-EVs. Subsequently, the leaflet scaffolds were cultured with 5x10⁴ ADSCs in 30 µl of DMEM at 37°C and 5% CO₂ and maintained in hanging drop plates for 24 h. Next, the fragments were transferred to ultralow attachment 6-well plates, and 10 µg/ml of LVE-EVs were added to each well. After 3 and 7 days of culture, the samples were collected, fixed in 4% PFA and embedded in Tissue Tek O.C.T. compound.

The samples were sectioned into 15 µm slices and stained with DAPI. The histological preparations were photographed (10X magnification) to register the entire fragment. To determine the percentage of recellularization, the number of cells in

each slice was quantified manually, and the area of fragment was defined using NIH ImageJ software v. 1.45s.

3.5.12 Statistical analysis

The experimental procedures were analyzed for statistical significance with GraphPad PRISM 6.0 software (GraphPad Software), using Student's t-test or one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's multiple comparisons. The differences between means were considered significant if $p \leq 0.05$. The results are expressed as the means \pm standard error of the mean (SEM).

Author Contributions: Amanda Leitolis performed the experiments and prepared the manuscript. Addeli B. B. Angulski performed the experiments. Alejandro Correa and Marco A. Stimamiglio designed the experiments and provided experimental support. Paula H. Suss, João G. Roderjan and Francisco D. A. da Costa contributed with sample collection and to the discussion. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

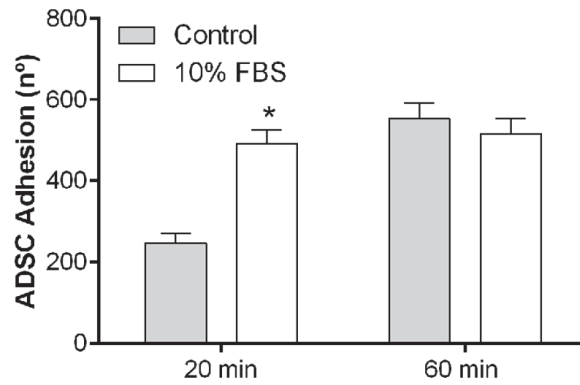
Funding: This study was supported by the National Health Fund, Brazilian Ministry of Health (Grant number 814611/2014) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

3.5.13 Acknowledgments

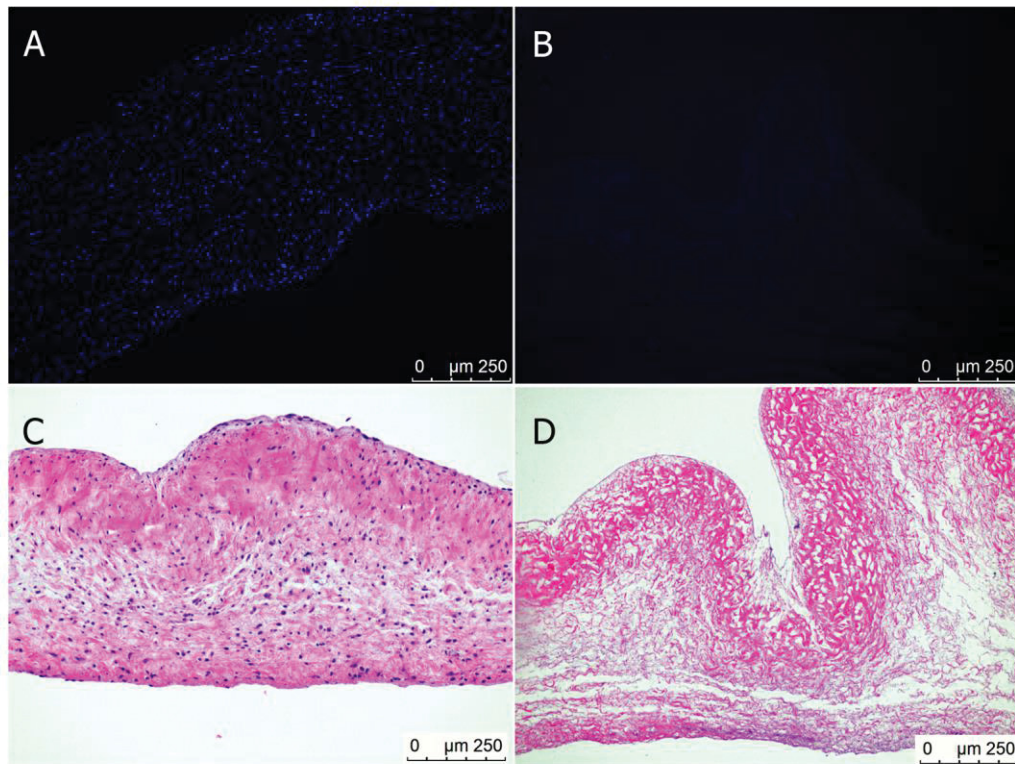
The authors thank the staff of Carlos Chagas Institute (Fiocruz-PR) for laboratory and administrative support and the staff of the Homograft Bank (Human Tissue Bank - PUCPR) for tissue collection. We would like to thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of the flow cytometry core facility, mass spectrometry facility and microscopy facility.

Conflicts of Interest: "The authors declare that there are no conflicts of interest."

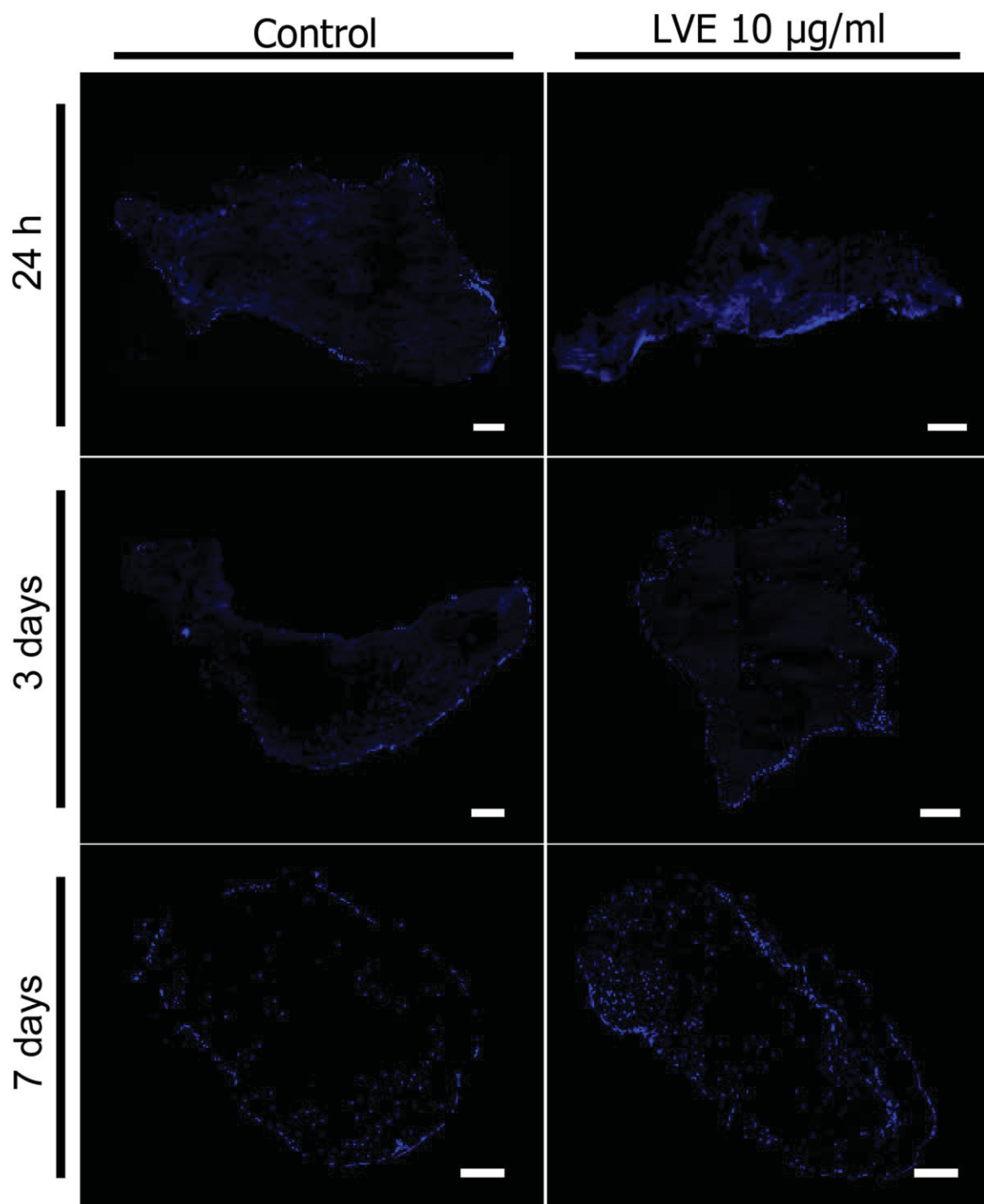
3.6 SUPPLEMENTARY MATERIAL



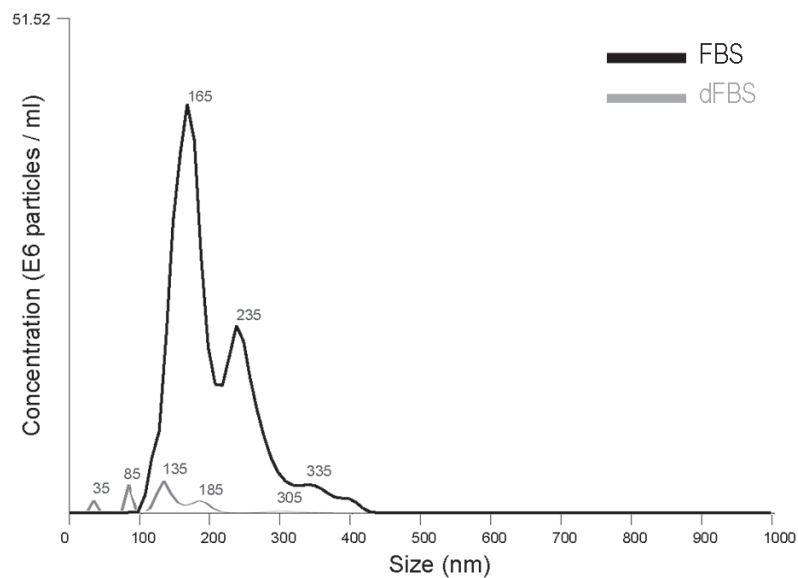
Paper hH-EVs. Figure S1 Standardization of the cell adhesion assay performed with ADSC cells. * $p < 0.05$.



Paper hH-EVs. Figure S2. Analysis of the efficiency of decellularization. Representative images from native leaflets stained with DAPI (A) and H&E (C) and decellularized leaflets stained with DAPI (B) and H&E (D).



Paper hH-EVs. Figure S3. Representative images of recellularized fragments previously coated with 10 µg/ml LVE-EVs and cultivated with ADSCs for 24h; and recellularized fragments cultivated with ADSCs for 24h, stimulated with 10 µg/ml LVE-EVs and then cultivated for 3 and 7 days. Scale bar = 250 µm.



Paper hH-EVs. Figure S4. Representative graphic from NTA images of FBS and dFBS. The dFBS was obtained from the supernatant of FBS ultracentrifuged at 100,000 g for 20 hours. The samples were prepared at 10% (same concentration used in explant cultures) and diluted 20-fold in PBS before the analysis.

3.7 REFERENCES

- [1] K. A. Gerbin and C. E. Murry, "The winding road to regenerating the human heart," *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 24, no. 3, pp. 133–140, May 2015.
- [2] A. R. Pinto, A. Illykh, M. J. Ivey, J. T. Kuwabara, M. L. D'antoni, R. Debuque, A. Chandran, L. Wang, K. Arora, N. A. Rosenthal, and M. D. Tallquist, "Revisiting cardiac cellular composition," *Circ. Res.*, vol. 118, no. 3, pp. 400–409, 2016.
- [3] A. M. de Aguiar, C. Kuligovski, M. T. B. A. da Costa, M. A. Stimamiglio, C. L. K. Rebelatto, A. C. Senegaglia, P. R. S. Brofman, B. Dallagiovanna, S. Goldenberg, and A. Correa, "Alkaline phosphatase-positive cells isolated from human hearts have mesenchymal stem cell characteristics," *Stem Cell Discov.*, vol. 01, no. 03, pp. 71–80, 2011.
- [4] T. L. Reus, A. W. Robert, M. B. A. Da Costa, A. M. de Aguiar, and M. A. Stimamiglio, "Secretome from resident cardiac stromal cells stimulates proliferation, cardiomyogenesis and angiogenesis of progenitor cells," *Int. J. Cardiol.*, vol. 221, pp. 396–403, 2016.
- [5] R. Jackson, S. Mount, B. Ye, A. E. Mayfield, V. Chan, M. Boodhwani, R. A. Davies, H. Haddad, and D. R. Davis, "Isolation of human explant derived cardiac stem cells from cryopreserved heart tissue," pp. 1–14, 2017.
- [6] E. Marbán and E. Cingolani, "Heart to heart: Cardiospheres for myocardial regeneration," *HRTM*, vol. 9, no. 10, pp. 1727–1731, 2012.
- [7] R. R. Smith, L. Barile, C. H. Cho, M. K. Leppo, J. M. Hare, E. Messina, A. Giacomello, R. Abraham, and E. Marbán, "Regenerative Potential of Cardiosphere-Derived Cells Expanded From Percutaneous Endomyocardial Biopsy Specimens," *Circulation*, vol. 115, pp. 896–908, 2007.
- [8] L. Urbanelli, A. Magini, S. Buratta, A. Brozzi, K. Sagini, A. Polchi, B. Tancini, and C. Emiliani, "Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate," *Genes (Basel)*, vol. 4, no. 2, pp. 152–170, 2013.
- [9] E. R. Abels and X. O. Breakefield, "Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake," *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 36, no. 3, pp. 301–312, 2016.
- [10] E. Chargaff and R. West, "The Biological Significance of the thromboplastic protein of blood," no. 7, 1946.
- [11] F. Dignat-George and C. M. Boulanger, "The many faces of endothelial microparticles," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 1, pp. 27–33, 2011.
- [12] J. D. Hutcheson and E. Aikawa, "Extracellular vesicles in cardiovascular homeostasis and disease," *Curr. Opin. Cardiol.*, vol. 33, no. 3, pp. 290–297, 2018.
- [13] F. J. Alibhai, S. W. Tobin, A. Yeganeh, R. D. Weisel, and R.-K. Li, "Emerging roles of extracellular vesicles in cardiac repair and rejuvenation," *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.*, vol. 315, no. 4, pp. H733–H744, 2018.
- [14] S. El Andaloussi, I. Mäger, X. O. Breakefield, and M. J. A. Wood, "Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 12, no. 5, pp. 347–357, 2013.

- [15] L.-L. Lv, W.-J. Wu, Y. Feng, Z.-L. Li, T.-T. Tang, and B.-C. Liu, "Therapeutic application of extracellular vesicles in kidney disease: promises and challenges," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 22, no. 2, pp. 728–737, 2017.
- [16] H. Xie, Z. Wang, L. Zhang, Q. Lei, A. Zhao, H. Wang, Q. Li, Y. Cao, W. Jie Zhang, and Z. Chen, "Extracellular Vesicle-functionalized Decalcified Bone Matrix Scaffolds with Enhanced Pro-angiogenic and Pro-bone Regeneration Activities," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. March, pp. 1–13, 2017.
- [17] M. Namiri, M. Kazemi Ashtiani, O. Mashinchian, M. M. Hasani-Sadrabadi, M. Mahmoudi, N. Aghdami, and H. Baharvand, "Engineering natural heart valves: possibilities and challenges," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 4, no. 7, pp. 524–531, 2016.
- [18] M. Della Barbera, M. Valente, C. Basso, and G. Thiene, "Morphologic studies of cell endogenous repopulation in decellularized aortic and pulmonary homografts implanted in sheep," *Cardiovasc. Pathol.*, vol. 24, no. 2, pp. 102–109, 2015.
- [19] D. Y. Cheung, B. Duan, and J. T. Butcher, "Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 15, no. 8, pp. 1155–1172, Aug. 2015.
- [20] A. J. Weinhaus and K. P. Roberts, *Anatomy of the Human Heart*, Chapter 4. 2005.
- [21] O. Bergmann, S. Zdunek, A. Felker, M. Salehpour, K. Alkass, S. Bernard, S. L. Sjöström, M. Szewczykowska, T. Jackowska, C. Dos Remedios, T. Malm, M. Andrä, R. Jashari, J. R. Nyengaard, G. Possnert, S. Jovinge, H. Druid, and J. Frisén, "Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart," *Cell*, vol. 161, no. 7, pp. 1566–1575, 2015.
- [22] P. Zhou and W. T. Pu, "Recounting cardiac cellular composition," *Circ. Res.*, vol. 118, no. 3, pp. 368–370, 2017.
- [23] D. R. Davis, Y. Zhang, R. R. Smith, K. Cheng, J. Terrovitis, K. Malliaras, T. Li, A. White, R. Makkar, and E. Marba, "Validation of the Cardiosphere Method to Culture Cardiac Progenitor Cells from Myocardial Tissue," *PLoS One*, vol. 4, no. 9, 2009.
- [24] S. Borosch, E. Dahmen, C. Beckers, C. Stoppe, E. M. Buhl, B. Denecke, A. Goetzenich, and S. Kraemer, "Characterization of extracellular vesicles derived from cardiac cells in an in vitro model of preconditioning," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 6, no. 1, 2017.
- [25] C. Yarana, D. Carroll, J. Chen, L. Chaiswing, Y. Zhao, T. Noel, M. Alstott, Y. Bae, E. V. Dressler, J. A. Moscow, D. A. Butterfield, H. Zhu, and D. K. St. Clair, "Extracellular Vesicles Released by Cardiomyocytes in a Doxorubicin-Induced Cardiac Injury Mouse Model Contain Protein Biomarkers of Early Cardiac Injury," *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 7, pp. 1644–1653, 2018.
- [26] L. Barile, V. Lionetti, E. Cervio, M. Matteucci, M. Gherghiceanu, L. M. Popescu, T. Torre, F. Siclari, T. Moccetti, and G. Vassalli, "Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction," *Cardiovasc. Res.*, vol. 103, no. 4, pp. 530–541, 2014.

- [27] L. Barile, G. Milano, and G. Vassalli, "Beneficial effects of exosomes secreted by cardiac-derived progenitor cells and other cell types in myocardial ischemia," *Stem Cell Investig.*, pp. 93–93, 2017.
- [28] B. Liu, B. W. Lee, K. Nakanishi, A. Villasante, R. Williamson, J. Metz, J. Kim, M. Kanai, L. Bi, K. Brown, G. Di Paolo, S. Homma, P. A. Sims, V. K. Topkara, and G. Vunjak-Novakovic, "Cardiac recovery via extended cell-free delivery of extracellular vesicles secreted by cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 2, no. 5, pp. 293–303, May 2018.
- [29] J. Veevers-Lowe, S. G. Ball, A. Shuttleworth, and C. M. Kielty, "Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through $\alpha 5 \beta 1$ -integrin-mediated activation of PDGFR- and potentiation of growth factor signals," *J. Cell Sci.*, vol. 124, no. 8, pp. 1288–1300, 2011.
- [30] X. Liu, H. Tian, H. Li, C. Ge, F. Zhao, M. Yao, and J. Li, "Derivate isocorydine (d-ICD) suppresses migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell by downregulating ITGA1 expression," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 3, 2017.
- [31] Q. M. Zheng, X. Y. Chen, Q. F. Bao, J. Yu, and L. H. Chen, "ILK enhances migration and invasion abilities of human endometrial stromal cells by facilitating the epithelial–mesenchymal transition," *Gynecol. Endocrinol.*, vol. 0, no. 0, pp. 1–6, 2018.
- [32] L. Zu, C. Ren, B. Pan, B. Zhou, E. Zhou, C. Niu, X. Wang, M. Zhao, W. Gao, L. Guo, and L. Zheng, "Endothelial microparticles after antihypertensive and lipid-lowering therapy inhibit the adhesion of monocytes to endothelial cells ☆," *Int. J. Cardiol.*, vol. 202, pp. 756–759, 2016.
- [33] F. Jansen, X. Yang, K. Baumann, D. Przybilla, T. Schmitz, A. Flender, K. Paul, A. Alhusseiny, G. Nickenig, and N. Werner, "Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism Cell culture and EMP generation," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 19, no. 9, pp. 2202–2214, 2015.
- [34] N. A. Garcia, I. Ontoria-Oviedo, H. González-King, A. Diez-Juan, and P. Sepúlveda, "Glucose starvation in cardiomyocytes enhances exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells," *PLoS One*, vol. 10, no. 9, pp. 1–23, 2015.
- [35] D. Todorova, S. Simoncini, R. Lacroix, F. Sabatier, and F. Dignat-George, "Extracellular vesicles in angiogenesis," *Circ. Res.*, vol. 120, no. 10, pp. 1658–1673, 2017.
- [36] G. Taraboletti, S. D'Ascenzo, P. Borsotti, R. Giavazzi, A. Pavan, and V. Dolo, "Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells," *Am. J. Pathol.*, vol. 160, no. 2, pp. 673–680, 2002.
- [37] A. Crabbé, Y. Liu, S. F. Sarker, N. R. Bonenfant, J. Barrila, Z. D. Borg, J. J. Lee, D. J. Weiss, and C. a. Nickerson, "Recellularization of Decellularized Lung Scaffolds Is Enhanced by Dynamic Suspension Culture," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, p. e0126846, 2015.
- [38] C. Williams, E. Budina, W. L. Stoppel, K. E. Sullivan, S. Emani, S. M. Emani, and L. D. Black, "Cardiac extracellular matrix–fibrin hybrid scaffolds with tunable properties for cardiovascular tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 14, pp. 84–95, 2015.

- [39] J. S. Lee, A. N. Cho, Y. Jin, J. Kim, S. Kim, and S. W. Cho, "Bio-artificial tongue with tongue extracellular matrix and primary taste cells," *Biomaterials*, vol. 151, pp. 24–37, 2018.
- [40] M. A. Heuschkel, A. Leitolis, J. G. Roderjan, P. H. Suss, C. A. O. Luzia, F. D. A. da Costa, A. Correa, and M. A. Stimamiglio, "In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering," *Xenotransplantation*, 2018.
- [41] F. Costa, P. Dohmen, E. Vieira, S. V. Lopes, C. Colatusso, E. W. L. Pereira, C. N. Matsuda, and S. Cauduro, "Ross Operation with decellularized pulmonary allografts: medium-term results.," *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, vol. 22, no. 4, pp. 454–62, 2007.
- [42] M. Namiri, M. Kazemi Ashtiani, S. Abbasalizadeh, Z. Mazidi, E. Mahmoudi, S. Nikeghbalian, N. Aghdami, and H. Baharvand, "Improving the biological function of decellularized heart valves through integration of protein tethering and three-dimensional cell seeding in a bioreactor," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, no. October 2016, pp. 1–15, 2017.
- [43] X. Ye, H. Wang, J. Zhou, H. Li, J. Liu, Z. Wang, A. Chen, and Q. Zhao, "The Effect of Heparin-VEGF Multilayer on the Biocompatibility of Decellularized Aortic Valve with Platelet and Endothelial Progenitor Cells," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, 2013.
- [44] J. E. Jordan, J. K. Williams, S. Lee, D. Raghavan, A. Atala, and J. J. Yoo, "Bioengineered self-seeding heart valves," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 143, no. 1, pp. 201–208.
- [45] D. Schmidt and S. P. Hoerstrup, "Tissue engineered heart valves based on human cells," *Swiss Med. Wkly.*, vol. 137, no. Suppl 155, 2007.
- [46] S. Cebotari, H. Mertsching, K. Kallenbach, S. Kostin, O. Repin, A. Batrinac, C. Kleczka, A. Ciubotaru, and A. Haverich, "Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix.," *Circulation*, vol. 106, no. 12 Suppl 1, pp. I63–I68, 2002.
- [47] A. B. B. Angulski, L. G. Capriglione, M. Batista, B. H. Marcon, A. C. Senegaglia, M. A. Stimamiglio, and A. Correa, "The Protein Content of Extracellular Vesicles Derived from Expanded Human Umbilical Cord Blood-Derived CD133+ and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Partially Explains Why both Sources are Advantageous for Regenerative Medicine," *Stem Cell Rev. Reports*, vol. 13, no. 2, pp. 244–257, 2017.

4 DISCUSSÃO GERAL

A perda de partes de um tecido ou de um órgão inteiro permanece um desafio evidente para a medicina regenerativa, não só do ponto de vista da complexidade desse problema de saúde, como também da reconhecida escassez do que poderia significar a solução para esses pacientes: a doação de órgãos. Atualmente, a falta de órgãos disponíveis é o fator limitante que impede o transplante bem sucedido de milhares de pacientes ao redor do mundo (Cooper et al. 2018). De acordo com a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), de Janeiro a Março de 2019, além da queda na taxa de aproveitamento de órgãos doados, houve também queda na taxa de doadores efetivos. O índice de transplante hepático, por exemplo, apresentou a primeira queda em dez anos.

Diante das necessidades apresentadas, muitos esforços científicos foram direcionados ao progresso da área de engenharia de tecidos, que tem por objetivo o desenvolvimento de substitutos para manutenção, reconstrução ou regeneração de órgãos ou tecidos (Khademhosseini & Langer 2016). Nesse contexto, a utilização de tecidos animais (xenoenxertos) pode representar uma fonte potencialmente ilimitada para o desenvolvimento de órgãos e outros tecidos substitutos viáveis e funcionais (Naso & Gandaglia 2018). No caso do tratamento de valvopatias, os xenotransplantes já são uma alternativa terapêutica viável (Aristizabal et al. 2017). Estão disponíveis comercialmente, por exemplo, as próteses sem estente (*stentless*) Freestyle™ Medtronic e Edwards Prima Plus®. Entretanto, assim como outros tipos de tecidos xenogênicos utilizados em humanos, as próteses valvares disponíveis para uso clínico são fixadas com glutaraldeído, utilizado para mascarar antígenos como alfa-Gal, esterilizar o tecido e torná-lo resistente a degeneração. Em 2006, Dohmen e colaboradores propuseram o desenvolvimento de uma válvula cardíaca porcina livre de glutaraldeído com potencial de remodelação, regeneração e crescimento com o receptor. A partir de então, o desenvolvimento de próteses valvares atingiu outro nível, não era apenas necessário obter um substituto que funcionasse mecanicamente, mas que também formasse um tecido vivo.

Nesse contexto, a tecnologia de descelularização tecidual emergiu como uma nova abordagem para superar a rejeição hiperaguda e o risco de transmissão de zoonoses, potencialmente causados pelos xenoenxertos, e assim permitir a aplicação generalizada de tecidos xenogênicos não fixados (revisado por Orlando et

al. 2011). Em 2011, Orlando e colaboradores, propuseram o termo semi-xenotransplante para designar a ação de transplantar um arcabouço descelularizado animal em um paciente humano. Teoricamente, o uso desses arcabouços pode combinar a disponibilidade e reprodutibilidade dos tecidos animais, com a biocompatibilidade e funcionalidade dos aloenxertos (Salvatori et al. 2015).

No primeiro capítulo deste estudo, comparamos a eficiência de duas metodologias de descelularização aplicadas em válvulas cardíacas porcinas e avaliamos a biocompatibilidade das próteses produzidas utilizando células humanas. Como mencionado anteriormente, Crapo e colaboradores estabeleceram em 2011 os critérios mínimos para a descelularização tecidual. Apesar disso, nos anos seguintes muitos materiais virtualmente descelularizados, mas que não foram completamente caracterizados passaram a ser utilizados clinicamente (Kawecki et al. 2018). Com o interesse clínico por tecidos acelulares crescendo, Kawecki e colaboradores (2018) sugeriram novos critérios para o controle de qualidade das matrizes biológicas produzidas. Desse modo, esses autores propuseram que além dos critérios estabelecidos por Crapo, outras propriedades deveriam ser avaliadas, sendo elas: ausência de compartimentos de membrana intracelular (ex. mitocôndria); ausência de elementos de membrana celular; presença de elementos de MEC não removidos e não danificados, e ausência de citotoxicidade. Ao longo deste trabalho, ficou evidente a dificuldade de se obter uma válvula cardíaca descelularizada que atenda a todos esses critérios. Os protocolos aplicados resultaram em próteses não citotóxicas, com quantidades reduzidas de DNA, compatíveis com CTMs e VIC, e com potencial de remodelamento. Entretanto, a avaliação do desempenho das próteses descelularizadas VPD-B e VPD-S em um organismo vivo permanece em aberto. Nesse tipo de experimento seria possível avaliar comparativamente a hemodinâmica das próteses, eventuais respostas imunogênicas e de calcificação, além de remodelamento e recelularização por células do hospedeiro da prótese.

De fato, a repopulação da matriz descelularizada pode modular a resposta do receptor ao tecido transplantado (Namiri, Ashtiani, et al. 2017). Entretanto, uma recelularização autóloga e completa de válvulas descelularizadas ainda não foi possível. Nesse sentido, uma série de investigações tem utilizado biomoléculas ou condicionamento químico para melhorar a recelularização após o implante (revisado por VeDepo et al. 2017). No segundo capítulo deste trabalho reportamos, pela

primeira vez, que o uso de vesículas extracelulares de origem cardíaca (hH-EVs) pode favorecer a repopulação de válvulas descelularizadas. Antes de aplicá-las no co-cultivo *in vitro*, avaliamos a capacidade das hH-EVs na modulação da migração, proliferação, adesão e angiogênese de CTMs e células endoteliais. Nós observamos, através de análise proteômica, que o conjunto de proteínas encontradas em hH-EVs pode exibir propriedades regenerativas. Em etapas posteriores, testaremos a habilidade das hH-EVs em melhorar a recelularização de arcabouços VPD-B. Desse modo, será possível determinar se essas vesículas são capazes de melhorar significativamente a repopulação de um arcabouço de matriz mais alterada e até mesmo levar a recelularização de VPD-B aos mesmos níveis da obtida em VPD-S.

De acordo com as Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgãos e Tecidos da ABTO, a captação de válvulas cardíacas de doadores cadavéricos é realizada após esgotadas todas as possibilidades de transplante do coração inteiro. Considerando que o tempo de isquemia máximo para o transplante de coração é de 4 horas, as válvulas, assim como outros tecidos, são captadas de doadores com parada cardíaca não recente (até 6 horas). Em nossos experimentos, fizemos o isolamento de hH-EVs a partir de tecido descartado da dissecação de válvulas cardíacas. Considerando os resultados obtidos, podemos sugerir que subprodutos da doação de tecidos, como as VEs, podem também ser aproveitados após a captação e tem potencial para auxiliar na regeneração do tecido implantado.

Apesar das limitações encontradas, com os dados gerados no presente trabalho acreditamos ter contribuído para o desenvolvimento de novas estratégias que auxiliem o progresso e a superação dos desafios atuais na área de engenharia de tecidos.

5 CONCLUSÕES

A descelularização aplicada no grupo VPD-S produziu enxertos com cúspides e condutos acelulares e diminuiu significativamente a quantidade de DNA presente nos tecidos em menos 42% no conduto e 37,29% no músculo. Entretanto, fragmentos de DNA acima de 300 pb foram observados em todas as amostras. Além disso, o processo reduziu o conteúdo de GAG nas cúspides, mas não alterou as demais moléculas de MEC avaliadas.

O processo de descelularização aplicado no grupo VPD-B resultou em enxertos completamente acelulares, com menos de 10% de DNA remanescente e altamente fragmentado (menos de 123 pb). Entretanto, colágeno, elastina e GAG parecem ter sido parcialmente removidos ou alterados após o processo.

Após ambos os protocolos, os tecidos apresentaram remanescentes celulares como vimentina e alfa-Gal. Enquanto o alfa-Gal foi presente apenas no músculo dos enxertos VPD-S e VPD-B, resíduos de vimentina foram observados nos condutos e músculos de VPD-S e VPD-B.

Ambos os protocolos de descelularização resultaram em próteses que não apresentaram citotoxicidade avaliada por meio dos testes recomendados pela ISO 10993/5.

As válvulas VPD-S e VPD-B foram compatíveis com CTMs e VIC. Porém, as cúspides do grupo VPD-S foram recelularizadas mais eficientemente que os tecidos do grupo VPD-B no mesmo período de tempo. Além disso, o remodelamento da MEC das cúspides VPD-B ocorreu tardiamente em relação ao observado em VPD-S.

As hH-EVs são compostas por partículas de 30 a 400 nm que apresentam conteúdo proteico interessante para medicina regenerativa. Essas vesículas podem estimular a migração e diminuir a adesão de CTMs, além de induzir a proliferação e a angiogênese *in vitro* de HUVEC.

Quando testadas em modelo de co-cultivo, as hH-EVs isoladas do endocárdio do ventrículo esquerdo (LVE-EVs) foram capazes de estimular a recelularização de cúspides VPD-S com CTMs após 3 e 7 dias.

6 REFERÊNCIAS

- Abels, Erik R. and Xandra O. Breakefield. 2016. "Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake." *Cellular and Molecular Neurobiology* 36(3):301–12.
- Akbari Zahmati, Amir Hossein, Reza Alipoor, Arash Rezaei Shahmirzadi, Vahid Khor, and Mohammad Mahdi Abolhasani. 2017. "Chemical Decellularization Methods and Its Effects on Extracellular Matrix." *Internal Medicine and Medical Investigation Journal* 2(3):76.
- Akhyari, Payam, Hug Aubin, Patricia Gwanmesia, Mareike Barth, Stefanie Hoffmann, Jörn Huelsmann, Karlheinz Preuss, and Artur Lichtenberg. 2011. "The Quest for an Optimized Protocol for Whole-Heart Decellularization: A Comparison of Three Popular and a Novel Decellularization Technique and Their Diverse Effects on Crucial Extracellular Matrix Qualities." *Tissue Engineering Part C: Methods* 17(9):915–26.
- Allan, David S., Alvin Tieu, Manoj Lalu, and Dylan Burger. 2019. "Concise Review: Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles for Regenerative Therapy and Immune Modulation: Progress and Challenges Toward Clinical Application." *STEM CELLS Translational Medicine* sctm.19-0114.
- Alshaikh, Ahmed Baker, Arvind Manikantan Padma, Matilda Dehlin, Randa Akouri, Min Jong Song, Mats Brännström, and Mats Hellström. 2019. "Decellularization of the Mouse Ovary: Comparison of Different Scaffold Generation Protocols for Future Ovarian Bioengineering." *Journal of Ovarian Research* 12(1):1–9.
- Althunayyan, Aeshah, Steffen E. Petersen, Guy Lloyd, and Sanjeev Bhattacharyya. 2019. "Mitral Valve Prolapse." *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 17(1):43–51.
- El Andaloussi, Samir, Imre Mäger, Xandra O. Breakefield, and Matthew J. A. Wood. 2013. "Extracellular Vesicles: Biology and Emerging Therapeutic Opportunities." *Nature Reviews Drug Discovery* 12(5):347–57.
- Anderson, R. H. 2002. "Anatomy: Clinical Anatomy of the Aortic Root." *Heart* 84(6):670–73.
- Aristizabal, Ana María, Luis Armando Caicedo, Juan Manuel Martínez, Manuel Moreno, and Gabriel J. Echeverri. 2017. "Clinical Xenotransplantation, a Closer Reality: Literature Review." *Cirugía Española (English Edition)* 95(2):62–72.
- Autissier, Patrick, Caroline Soulas, Tricia H. Burdo, and Kenneth C. Williams. 2010. "Evaluation of a 12-Color Flow Cytometry Panel to Study Lymphocyte, Monocyte, and Dendritic Cell Subsets in Humans." *Cytometry Part A* 77(5):410–19.
- Bäck, Magnus, T. Christian Gasser, Jean Baptiste Michel, and Giuseppina

Caligiuri. 2013. "Biomechanical Factors in the Biology of Aortic Wall and Aortic Valve Diseases." *Cardiovascular Research* 99(2):232–41.

Bakhshandeh, Behnaz, Payam Zarrintaj, Mohammad Omid Oftadeh, Farid Keramati, Hamideh Fouladiha, Salma Sohrabi-jahromi, and Zarrintaj Ziraksaz. 2017. "Tissue Engineering; Strategies, Tissues, and Biomaterials." *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 33(2):144–72.

Barile, Lucio, Vincenzo Lionetti, Elisabetta Cervio, Marco Matteucci, Mihaela Gherghiceanu, Laurentiu M. Popescu, Tiziano Torre, Francesco Siclari, Tiziano Moccetti, and Giuseppe Vassalli. 2014. "Extracellular Vesicles Fromhuman Cardiac Progenitor Cells Inhibit Cardiomyocyte Apoptosis and Improve Cardiac Function Aftermyocardial Infarction." *Cardiovascular Research* 103(4):530–41.

Batista, GS and SM Amaral. 2009. "Diretrizes Brasileiras Para o Diagnóstico, Tratamento e Prevenção Da Febre Reumática." *Arq Bras Cardiol* 93(4):1–18.

Bjørge, I. M., S. Y. Kim, J. F. Mano, B. Kalionis, and W. Chrzanowski. 2018. "Extracellular Vesicles, Exosomes and Shedding Vesicles in Regenerative Medicine-a New Paradigm for Tissue Repair." *Biomaterials Science* 6(1):60–78.

Bodnar, E., E. G. J. Olsen, R. Florio, and J. Dobrin. 1986. "Damage of Porcine Aortic Valve Tissue Caused by the Surfactant Sodiumdodecylsulphate." *Thoracic and Cardiovascular Surgeon* 34(2):82–85.

Bogdanova, Maria, Aleksandra Kostina, Katarina Zihlavitnikova Enayati, Arsenii Zibirnyk, Anna Malashicheva, Kåre Olav Stensløkken, Gareth John Sullivan, Mari Liis Kaljusto, John Peder Escobar Kvitting, Anna Kostareva, Jarle Vaage, and Arkady Rutkovskiy. 2018. "Inflammation and Mechanical Stress Stimulate Osteogenic Differentiation of Human Aortic Valve Interstitial Cells." *Frontiers in Physiology* 9(NOV).

Boroumand, Safieh, Shiva Asadpour, Aram Akbarzadeh, Reza Faridi-Majidi, and Hossein Ghanbari. 2018. "Heart Valve Tissue Engineering: An Overview of Heart Valve Decellularization Processes." *Regenerative Medicine* 13(1):41–54.

Brizzi, Maria Felice, Guido Tarone, and Paola Defilippi. 2012. "Extracellular Matrix, Integrins, and Growth Factors as Tailors of the Stem Cell Niche." *Current Opinion in Cell Biology* 24(5):645–51.

Butcher, Jonathan T. and Roger R. Markwald. 2007. "Valvulogenesis: The Moving Target." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362(1484):1489–1503.

Butcher, Jonathan T. and Robert M. Nerem. 2006. "Valvular Endothelial Cells Regulate the Phenotype of Interstitial Cells in Co-Culture: Effects of Steady Shear Stress." *Tissue Engineering* 12(4):905–15.

Butcher, Jonathan T., Andrea M. Penrod, Andrés J. García, and Robert M. Nerem. 2004. "Unique Morphology and Focal Adhesion Development of Valvular Endothelial Cells in Static and Fluid Flow Environments." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24(8):1429–34.

Cebotari, Serghei, Heike Mertsching, Klaus Kallenbach, Sawa Kostin, Oleg Repin, Aurel Batrinac, Carmen Kleczka, Anatol Ciubotaru, Axel Haverich, and Allograft Matrix. 2002. "Construction of Autologous Human Heart Valves Based On." *Circulation* 106(12 Suppl 1):I63--I68.

Chalajour, Fariba, Hendrik Treede, Ursula M. Gehling, Alireza Ebrahimnejad, Dieter H. Boehm, Robert K. Riemer, Suleyman Ergun, and Hermann Reichenspurner. 2007. "Identification and Characterization of Cells with High Angiogenic Potential and Transitional Phenotype in Calcific Aortic Valve." *Experimental Cell Research* 313(11):2326–35.

Charitos, Efstratios I. and Hans-Hinrich Sievers. 2013. "Anatomy of the Aortic Root: Implications for Valve-Sparing Surgery." *Annals of Cardiothoracic Surgery* 2(1):53–56.

Chen, Jan Hung and Craig A. Simmons. 2011. "Cell-Matrix Interactions in the Pathobiology of Calcific Aortic Valve Disease: Critical Roles for Matricellular, Matricrine, and Matrix Mechanics Cues." *Circulation Research* 108(12):1510–24.

Chen, Jan Hung, Cindy Ying Yin Yip, Eli D. Sone, and Craig A. Simmons. 2009. "Identification and Characterization of Aortic Valve Mesenchymal Progenitor Cells with Robust Osteogenic Calcification Potential." *American Journal of Pathology* 174(3):1109–19.

Cheung, Daniel Y., Bin Duan, and Jonathan T. Butcher. 2015. "Current Progress in Tissue Engineering of Heart Valves: Multiscale Problems, Multiscale Solutions." *Expert Opinion on Biological Therapy* 15(8):1155–72.

Chiu, Loraine L. Y. and Milica Radisic. 2010. "Scaffolds with Covalently Immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for Vascularization of Engineered Tissues." *Biomaterials* 31(2):226–41.

Choi, Jae-Hoon and Seung Hyun Lee. 2016. "Involvement of Immune Cell Network in Aortic Valve Stenosis: Communication between Valvular Interstitial Cells and Immune Cells." *Immune Network* 16(1):26–32.

Cooper, D. K. C., R. Gaston, D. Eckhoff, J. Ladowski, T. Yamamoto, L. Wang, H. Iwase, H. Hara, M. Tector, and A. J. Tector. 2018. "Xenotransplantation - The Current Status and Prospects." *British Medical Bulletin* 125(1):5–14.

Costa, Francisco, Pascal Dohmen, Eduardo Vieira, Sérgio Veiga Lopes, Claudinei Colatusso, Elaine Welk Lopes Pereira, Camila Naomi Matsuda, and Sanderson Cauduro. 2007a. "Ross Operation with Decellularized Pulmonary Allografts: Medium-Term Results." *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular: Órgão Oficial Da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 22(4):454–62.

Costa, Francisco, Pascal Dohmen, Eduardo Vieira, Sérgio Veiga Lopes, Claudinei Colatusso, Elaine Welk Lopes Pereira, Camila Naomi Matsuda, and Sanderson Cauduro. 2007b. "Ross Operation with Decelularized Pulmonary Allografts: Medium-Term Results." *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 22(4):454–62.

Costa, Marise Teresinha Brenner Affonso da, Francisco Diniz Affonso da Costa, Luciana Cristina Ferreti de Nazareno, Juliana Domchoski, Ângela Maria Peruzzo, Claudinei Colatusso, Carlos Henrique Gori Gomes, and Iseu Affonso da Costa. 2005. "Análise Das Atividades Dos Oito Anos Iniciais Do Banco de Valvas Cardíacas Humanas Do Hospital de Caridade Da Irmandade Da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba." *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 20(4):398–407.

Cox, Brian and Andrew Emili. 2006. "Tissue Subcellular Fractionation and Protein Extraction for Use in Mass-Spectrometry-Based Proteomics." *Nature Protocols* 1(4):1872–78.

Crapo, Peter M., Thomas W. Gilbert, and Stephen F. Badylak. 2011. "An Overview of Tissue and Whole Organ Decellularization Processes." *Biomaterials* 32(12):3233–43.

Dai, Jinchi, Weihua Qiao, Jiawei Shi, Chungeng Liu, Xingjian Hu, and Nianguo Dong. 2019. "Modifying Decellularized Aortic Valve Scaffolds with Stromal Cell-Derived Factor-1 α Loaded Proteolytically Degradable Hydrogel for Recellularization and Remodeling." *Acta Biomaterialia* 88:280–92.

Daly, K. A., S. Liu, V. Agrawal, B. N. Brown, S. A. Johnson, C. J. Medberry, and S. F. Badylak. 2012. "Damage Associated Molecular Patterns within Xenogeneic Biologic Scaffolds and Their Effects on Host Remodeling." *Biomaterials* 33(1):91–101.

Dohmen, P. M., F. Da Costa, S. Holinski, S. V. Lopes, S. Yoshi, L. H. Reichert, R. Villani, S. Posner, and W. Konertz. 2006. "Is There a Possibility for a Glutaraldehyde-Free Porcine Heart Valve to Grow?" *European Surgical Research* 38(1):54–61.

Dohmen, Pascal M., Alexander Lembcke, Sebastian Holinski, Dietmar Kivelitz, Jan P. Braun, Axel Pruss, and Wolfgang Konertz. 2007. "Mid-Term Clinical Results Using a Tissue-Engineered Pulmonary Valve to Reconstruct the Right Ventricular Outflow Tract During the Ross Procedure." *Annals of Thoracic Surgery* 84(3):729–36.

Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A. Keating, Dj Prockop, and Em Horwitz. 2006. "Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement." *Cytotherapy* 8(4):315–17.

Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35(4):495–516.

Fallahiarezoudar, Ehsan, Mohaddeseh Ahmadipourroudposht, Noordin Mohd Yusof, Ani Idris, and Nor Hasrul Akhmal Ngadiman. 2017. "3D Biofabrication of Thermoplastic Polyurethane (TPU)/Poly-L-Lactic Acid (PLLA) Electrospun Nanofibers Containing Maghemite (γ -Fe₂O₃) for Tissue Engineering Aortic Heart Valve." *Polymers* 9(11).

Farrar, Emily J. and Jonathan T. Butcher. 2015. "Heterogeneous Susceptibility of

Valve Endothelial Cells to Mesenchymal Transformation in Response to TNF α Emily." *Ann Biomed Eng* 42(1):149–61.

Ferreira, Renata Maria, Marise Teresinha Brenner Affonso da Costa, Osiris Canciglieri Junior, and Ângelo Márcio Oliveira Sant'Anna. 2016. "Profile of Heart Donors from the Human Valve Bank of the Santa Casa de Misericórdia de Curitiba." *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* 31(2):191–97.

Fountoulaki, Katerina and Nikolaos Dagres. 2015. "Cellular Communications in the Heart." *Cardiac Failure Review* 1(2):64.

Freitas-Ferraz, Afonso B., Gabriela Tirado-Conte, Francois Dagenais, Marc Ruel, Talal Al-Atassi, Eric Dumont, Siamak Mohammadi, Mathieu Bernier, Philippe Pibarot, and Josep Rodés-Cabau. 2019. "Aortic Stenosis and Small Aortic Annulus." *Circulation* 139(23):2685–2702.

Fu, Jian Hua, Man Zhao, Yan Rong Lin, Xu Dong Tian, Ya Dong Wang, Zhen Xing Wang, and Le Xin Wang. 2017. "Degradable Chitosan-Collagen Composites Seeded with Cells as Tissue Engineered Heart Valves." *Heart Lung and Circulation* 26(1):94–100.

Gautam, Sneh, Chia Fu Chou, Amit K. Dinda, Pravin D. Potdar, and Narayan C. Mishra. 2014. "Surface Modification of Nanofibrous Polycaprolactone/Gelatin Composite Scaffold by Collagen Type i Grafting for Skin Tissue Engineering." *Materials Science and Engineering C* 34(1):402–9.

Gilbert, Thomas W. 2012. "Strategies for Tissue and Organ Decellularization." *Journal of Cellular Biochemistry* 113(7):2217–22.

Gilbert, Thomas W., John M. Freund, and Stephen F. Badylak. 2009. "Quantification of DNA in Biologic Scaffold Materials." *Journal of Surgical Research* 152(1):135–39.

Go, Alan S., Dariush Mozaffarian, Véronique L. Roger, Emelia J. Benjamin, Jarett D. Berry, Michael J. Blaha, Shifan Dai, Earl S. Ford, Caroline S. Fox, Sheila Franco, Heather J. Fullerton, Cathleen Gillespie, Susan M. Hailpern, John A. Heit, Virginia J. Howard, Mark D. Huffman, Suzanne E. Judd, Brett M. Kissela, Steven J. Kittner, Daniel T. Lackland, Judith H. Lichtman, Lynda D. Lisabeth, Rachel H. Mackey, David J. Magid, Gregory M. Marcus, Ariane Marelli, David B. Matchar, Darren K. McGuire, Emile R. Mohler, Claudia S. Moy, Michael E. Mussolino, Robert W. Neumar, Graham Nichol, Dilip K. Pandey, Nina P. Paynter, Matthew J. Reeves, Paul D. Sorlie, Joel Stein, Amytis Towfighi, Tanya N. Turan, Salim S. Virani, Nathan D. Wong, Daniel Woo, and Melanie B. Turner. 2014. "Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update: A Report from the American Heart Association." *Circulation* 129(3):399–410.

Go, Alan S., Dariush Mozaffarian, Véronique L. Roger, Emelia J. Benjamin, Jarett D. Berry, William B. Borden, Dawn M. Bravata, Shifan Dai, Earl S. Ford, Caroline S. Fox, Sheila Franco, Heather J. Fullerton, Cathleen Gillespie, Susan M. Hailpern, John A. Heit, Virginia J. Howard, Mark D. Huffman, Brett M. Kissela, Steven J. Kittner, Daniel T. Lackland, Judith H. Lichtman, Lynda D. Lisabeth,

David Magid, Gregory M. Marcus, Ariane Marelli, David B. Matchar, Darren K. McGuire, Emile R. Mohler, Claudia S. Moy, Michael E. Mussolino, Graham Nichol, Nina P. Paynter, Pamela J. Schreiner, Paul D. Sorlie, Joel Stein, Tanya N. Turan, Salim S. Virani, Nathan D. Wong, Daniel Woo, and Melanie B. Turner. 2013. "Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2013 Update." *Circulation* 127(1):143–52.

Guruswamy Damodaran, Rajesh and Patrick Vermette. 2018. "Tissue and Organ Decellularization in Regenerative Medicine." *Biotechnology Progress* 34(6):1494–1505.

Hasan, Anwarul, Arghya Paul, Nihal E. Vrana, Xin Zhao, Adnan Memic, Yu-Shik Hwang, Mehmet R. Dokmeci, and Ali Khademhosseini. 2014. "Microfluidic Techniques for Development of 3D Vascularized Tissue." *Biomaterials* 35(26):7308–25.

Hasan, Anwarul, John Saliba, Hassan Pezeshgi Modarres, Ahmed Bakhaty, Amir Nasajpour, Mohammad R. K. Mofrad, and Amir Sanati-Nezhad. 2016. "Micro and Nanotechnologies in Heart Valve Tissue Engineering." *Biomaterials* 103(2016):278–92.

Haupt, Jessica, Georg Lutter, Stanislav N. Gorb, Dan T. Simionescu, Derk Frank, Jette Seiler, Alina Paur, and Irma Haben. 2018. "Detergent-Based Decellularization Strategy Preserves Macro- And Microstructure of Heart Valves." *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 26(2):230–36.

Heuschkel, Marina Augusto, Amanda Leitolis, João Gabriel Roderjan, Paula Hansen Suss, César Augusto Oleinik Luzia, Francisco Diniz Affonso da Costa, Alejandro Correa, and Marco Augusto Stimamiglio. 2019. "In Vitro Evaluation of Bovine Pericardium after a Soft Decellularization Approach for Use in Tissue Engineering." *Xenotransplantation* 26(2):1–11.

Hinton, Robert B. and Katherine E. Yutzey. 2011. "Heart Valve Structure and Function in Development and Disease." *Annual Review of Physiology* 73(1):29–46.

Hirt, Marc N., Arne Hansen, and Thomas Eschenhagen. 2014. "Cardiac Tissue Engineering : State of the Art." *Circulation Research* 114(2):354–67.

Hjortnaes, Jesper, Kayle Shapero, Claudia Goettsch, Joshua D. Hutcheson, Joshua Keegan, Jolanda Kluin, John E. Mayer, Joyce Bischoff, and Elena Aikawa. 2015. "Valvular Interstitial Cells Suppress Calcification of Valvular Endothelial Cells." *Atherosclerosis* 242(1):251–60.

Hof, Alexander, Silja Raschke, Karina Baier, Laura Nehrenheim, Jessica Isabel Selig, Markus Schomaker, Artur Lichtenberg, Heiko Meyer, and Payam Akhyari. 2016. "Challenges in Developing a Reseeded, Tissue-Engineered Aortic Valve Prosthesis." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 50(3):446–55.

Högerle, Benjamin A., Maria Schneider, Katrin Sudrow, Naima Souidi, Meaghan Stolk, Isabella Werner, Anna Biermann, Kelvin G. M. Brockbank, Ulrich A. Stock, and Martina Seifert. 2018. "Effects on Human Heart Valve Immunogenicity in

Vitro by High Concentration Cryoprotectant Treatment.” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12(2):e1046–55.

Ibrahim, Ahmed and Eduardo Marbán. 2016. “Exosomes: Fundamental Biology and Roles in Cardiovascular Physiology.” *Annual Review of Physiology* 78(1):67–83.

Ibrahim, Zuhaib, Jamie Busch, Michel Awwad, Robert Wagner, Kevin Wells, and David K. C. Cooper. 2006. “Selected Physiologic Compatibilities and Incompatibilities between Human and Porcine Organ Systems.” *Xenotransplantation* 13(6):488–99.

Jana, Soumen and Amir Lerman. 2019. “Behavior of Valvular Interstitial Cells on Trilayered Nanofibrous Substrate Mimicking Morphologies of Heart Valve Leaflet.” *Acta Biomaterialia* 85:142–56.

Jana, Soumen, Robert T. Tranquillo, and Amir Lerman. 2016. “Cells for Tissue Engineering of Cardiac Valves.” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 10(10):804–24.

Kawecki, Marek, Wojciech Łabuś, Agnieszka Klama-Baryla, Diana Kitala, Malgorzata Kraut, Justyna Glik, Marcelina Misiuga, Mariusz Nowak, Tomasz Bielecki, and Aleksandra Kasperczyk. 2018. “A Review of Decellurization Methods Caused by an Urgent Need for Quality Control of Cell-Free Extracellular Matrix’ Scaffolds and Their Role in Regenerative Medicine.” *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 106(2):909–23.

Khademhosseini, Ali and Robert Langer. 2016. “A Decade of Progress in Tissue Engineering.” *Nature Protocols* 11(10):1775–81.

Krejci, J. 2007. “Interaction of Mixture of Anionic Surfactants with Collagen.” *International Journal of Cosmetic Science* 29(2):121–29.

Kunzelman, K. F., RP Cochran, SS Murphree, WS Ring, ED Verrier, and RC Eberhart. 1993. “Differential Collagen Distribution in the Mitral Valve and Its Influence on Biomechanical Behavior.” *The Journal of Heart Valve Disease* 2:236–44.

Lamichhane, Tek N., Sonja Sokic, John S. Schardt, Rahul S. Raiker, Jennifer W. Lin, and Steven M. Jay. 2015. “Emerging Roles for Extracellular Vesicles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine.” *Tissue Engineering Part B: Reviews* 21(1):45–54.

Lanuti, Paola, Francesco Serafini, Laura Pierdomenico, Pasquale Simeone, Giuseppina Bologna, Eva Ercolino, Sara Di Silvestre, Simone Guarnieri, Carlo Canosa, Gianna Gabriella Impicciatore, Stella Chiarini, Francesco Magnacca, Maria Addolorata Mariggì, Assunta Pandolfi, Marco Marchisio, Gabriele Di Giammarco, and Sebastiano Miscia. 2015. “Human Mesenchymal Stem Cells Reendothelialize Porcine Heart Valve Scaffolds: Novel Perspectives in Heart Valve Tissue Engineering.” *BioResearch Open Access* 4(1):288–97.

Latif, Najma, Alfred Quillon, Padmini Sarathchandra, Ann McCormack, Alec

Lozanoski, Magdi H. Yacoub, and Adrian H. Chester. 2015. "Modulation of Human Valve Interstitial Cell Phenotype and Function Using a Fibroblast Growth Factor 2 Formulation." *PLoS ONE* 10(6):1–19.

Latif, Najma, Padmini Sarathchandra, Patricia M. Taylor, Joseph Antoniow, and Magdi H. Yacoub. 2005. "Localization and Pattern of Expression of Extracellular Matrix Components in Human Heart Valves." *The Journal of Heart Valve Disease* 14(2):218–27.

Leopold, Jane A. 2012. "Cellular Mechanisms of Aortic Valve Calcification." *Circulation: Cardiovascular Interventions* 5(4):605–14.

Li, Na and Jinlian Hua. 2017. "Interactions between Mesenchymal Stem Cells and the Immune System." *Cellular and Molecular Life Sciences* 74(13):2345–60.

Liao, Jun, Erinn M. Joyce, and Michael S. Sacks. 2008. "Effects of Decellularization on the Mechanical and Structural Properties of the Porcine Aortic Valve Leaflet." *Biomaterials* 29(8):1065–74.

Lisy, Milan, Guenay Kalender, Katja Schenke-Layland, Kelvin G. M. Brockbank, Anna Biermann, and Ulrich Alfred Stock. 2017. "Allograft Heart Valves: Current Aspects and Future Applications." *Biopreservation and Biobanking* 15(2):148–57.

Liu, Amber C., Vineet R. Joag, and Avrum I. Gotlieb. 2007. "The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology." *American Journal of Pathology* 171(5):1407–18.

Liu, Xiaohong, Ning Li, Dejun Gong, Cuiping Xia, and Zhiyun Xu. 2018. "Comparison of Detergent-Based Decellularization Protocols for the Removal of Antigenic Cellular Components in Porcine Aortic Valve." *Xenotransplantation* 25(2):1–13.

Liu, Ximeng and Shuko Harada. 2013. "DNA Isolation from Mammalian Samples." Pp. 1–13 in *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Manji, Rizwan A., Whayoung Lee, and David K. C. Cooper. 2015. "Xenograft Bioprosthetic Heart Valves: Past, Present and Future." *International Journal of Surgery* 23:280–84.

Masuda, Munetaka, Hideaki Kado, Yusuke Ando, Akira Shiose, Toshihide Nakano, Kouji Fukae, Yoshihisa Tanoue, and Ryuji Tominaga. 2008. "Intermediate-Term Results after the Aortic Valve Replacement Using Bileaflet Mechanical Prosthetic Valve in Children." *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 34(1):42–47.

Meier, Raphael P. H., Yannick D. Muller, Alexandre Balaphas, Philippe Morel, Manuel Pascual, Jörg D. Seebach, and Leo H. Buhler. 2018. "Xenotransplantation: Back to the Future?" *Transplant International* 31(5):465–77.

Meng, Xianzhong, Lihua Ao, Yong Song, Ashok Babu, Xiaoping Yang, Maorong Wang, Michael J. Weyant, Charles A. Dinarello, Joseph C. Cleveland, and David A. Fullerton. 2008. "Expression of Functional Toll-like Receptors 2 and 4 in Human Aortic Valve Interstitial Cells: Potential Roles in Aortic Valve Inflammation and Stenosis." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 294(1):C29–35.

Messier, Robert H., Barbara L. Bass, Hamdy M. Aly, Janice L. Jones, Patrick W. Domkowski, Robert B. Wallace, and Richard A. Hopkins. 1994. "Dual Structural and Functional Phenotypes of the Porcine Aortic Valve Interstitial Population: Characteristics of the Leaflet Myofibroblast." *Journal of Surgical Research* 57(1):1–21.

Mongkoldhumrongkul, Napachanok, Magdi H. Yacoub, and Adrian H. Chester. 2016. "Valve Endothelial Cells – Not Just Any Old Endothelial Cells." 14:146–54.

Mozaffarian, Dariush, Emelia J. Benjamin, Alan S. Go, Donna K. Arnett, Michael J. Blaha, Mary Cushman, Sandeep R. Das, Sarah De Ferranti, Jean Pierre Després, Heather J. Fullerton, Virginia J. Howard, Mark D. Huffman, Carmen R. Isasi, Monik C. Jiménez, Suzanne E. Judd, Brett M. Kissela, Judith H. Lichtman, Lynda D. Lisabeth, Simin Liu, Rachel H. MacKey, David J. Magid, Darren K. McGuire, Emile R. Mohler, Claudia S. Moy, Paul Muntner, Michael E. Mussolino, Khurram Nasir, Robert W. Neumar, Graham Nichol, Latha Palaniappan, Dilip K. Pandey, Mathew J. Reeves, Carlos J. Rodriguez, Wayne Rosamond, Paul D. Sorlie, Joel Stein, Amytis Towfighi, Tanya N. Turan, Salim S. Virani, Daniel Woo, Robert W. Yeh, and Melanie B. Turner. 2016. "Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report from the American Heart Association." *Circulation* 133(4):447–54.

Nagata, Shigekazu, Rikinari Hanayama, and Kohki Kawane. 2010. "Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells." *Cell* 140(5):619–30.

Namiri, Mehrnaz, Mohammad Kazemi Ashtiani, Omid Mashinchian, Mohammad Mahdi Hasani-Sadrabadi, Morteza Mahmoudi, Nasser Aghdami, and Hossein Baharvand. 2017. "Engineering Natural Heart Valves: Possibilities and Challenges." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 11(5):1675–83.

Namiri, Mehrnaz, Mohammad Kazemi Ashtiani, Saeed Abbasalizadeh, Zahra Mazidi, Elena Mahmoudi, Saman Nikeghbalian, Nasser Aghdami, and Hossein Baharvand. 2017. "Improving the Biological Function of Decellularized Heart Valves through Integration of Protein Tethering and Three-Dimensional Cell Seeding in a Bioreactor." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12(4):e1865–79.

Naso, Filippo and Alessandro Gandaglia. 2018. "Different Approaches to Heart Valve Decellularization: A Comprehensive Overview of the Past 30 Years." *Xenotransplantation* 25(1):1–10.

Navarro, Fábio Binhara, Francisco Diniz Affonso Da Costa, Leonardo Andrade Mulinari, Gustavo Klug Pimentel, João Gabriel Roderjan, Eduardo Discher

Vieira, Lúcia De Noronha, and Nelson Itiro Miyague. 2010. "Evaluation of the Biological Behavior of Decellularized Pulmonary Homografts: An Experimental Sheep Model." *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular: Orgao Oficial Da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 25(3):377–87.

O'Brien, Mark F. 1995. "Allograft Aortic Root Replacement: Standardization and Simplification of Technique." *The Annals of Thoracic Surgery* 60(SUPPL. 2):3–5.

Odedra, Devang, Loraine L. Y. Chiu, Molly Shoichet, and Milica Radisic. 2011. "Endothelial Cells Guided by Immobilized Gradients of Vascular Endothelial Growth Factor on Porous Collagen Scaffolds." *Acta Biomaterialia* 7(8):3027–35.

Olsson, Margareta, Mårten Rosenqvist, and Jan Nilsson. 1994. "Expression of HLA-DR Antigen and Smooth Muscle Cell Differentiation Markers by Valvular Fibroblasts in Degenerative Aortic Stenosis." *Journal of the American College of Cardiology* 24(7):1664–71.

Orlando, Giuseppe, Kathryn J. Wood, Robert J. Stratta, James J. Yoo, Anthony Atala, and Shay Soker. 2011. "Regenerative Medicine and Organ Transplantation: Past, Present, and Future." *Transplantation* 91(12):1310–17.

Osman, Lana, Adrian H. Chester, Mohamed Amrani, Magdi H. Yacoub, and Ryszard T. Smolenski. 2006. "A Novel Role of Extracellular Nucleotides in Valve Calcification A Potential Target for Atorvastatin." 566–72.

Paniagua Gutierrez, José Rodolfo, Helen Berry, Sotirios Korossis, Saeed Mirsadraee, Sergio Veiga Lopes, Francisco da Costa, John Kearney, Kevin Watterson, John Fisher, and Eileen Ingham. 2014. "Regenerative Potential of Low-Concentration SDS-Decellularized Porcine Aortic Valved Conduits In Vivo ." *Tissue Engineering Part A* 21(1–2):332–42.

Pérez, Román A., Jong-eun Won, Jonathan C. Knowles, and Hae-won Kim. 2012. "Naturally and Synthetic Smart Composite Biomaterials for Tissue Regeneration." *Advanced Drug Delivery Reviews*.

Pho, M., W. Lee, D. R. Watt, C. Laschinger, C. A. Simmons, and C. A. McCulloch. 2008. "Cofilin Is a Marker of Myofibroblast Differentiation in Cells from Porcine Aortic Cardiac Valves." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 294(4).

Pibarot, Philippe and Jean G. Dumesnil. 2009. "Prosthetic Heart Valves: Selection of the Optimal Prosthesis and Long-Term Management." *Circulation* 119(7):1034–48.

Platt, JEFFREY L., RICHARD J. FISCHER, ARTHUR J. MATAS, SALLY A. REIF, R. MORTON BOLMAN, and FRITZ H. BACH. 1991. "IMMUNOPATHOLOGY OF HYPERACUTE XENOGRFT REJECTION IN A SWINE-TO-PRIMATE MODEL." *Transplantation* 52(2):214–20.

Podestà, Manuel Alfredo, Giuseppe Remuzzi, and Federica Casiraghi. 2019. "Mesenchymal Stromal Cells for Transplant Tolerance." *Frontiers in Immunology* 10(June):1–15.

Quinn, Rachael W., Stephen L. Hilbert, Gabriel L. Converse, Arthur A. Bert, Eric Buse, William B. Drake, Matt Armstrong, Sara J. Moriarty, Gary K. Lofland, and Richard A. Hopkins. 2012. "Enhanced Autologous Re-Endothelialization of Decellularized and Extracellular Matrix Conditioned Allografts Implanted Into the Right Ventricular Outflow Tracts of Juvenile Sheep." *Cardiovascular Engineering and Technology* 3(2):217–27.

Raposo, Graça and Willem Stoorvogel. 2013. "Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends." *Journal of Cell Biology* 200(4):373–83.

Rieder, Erwin, Marie Theres Kasimir, Gerd Silberhumer, Gernot Seebacher, Ernst Wolner, Paul Simon, and Guenter Weigel. 2004. "Decellularization Protocols of Porcine Heart Valves Differ Importantly in Efficiency of Cell Removal and Susceptibility of the Matrix to Recellularization with Human Vascular Cells." *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 127(2):399–405.

Roosens, Annelies, Mahtab Asadian, Nathalie De Geyter, Pamela Somers, and Ria Cornelissen. 2017. "Complete Static Repopulation of Decellularized Porcine Tissues for Heart Valve Engineering: An in Vitro Study." *Cells Tissues Organs* 204(5–6):270–82.

Rutkovskiy, Arkady, Anna Malashicheva, Gareth Sullivan, Maria Bogdanova, Anna Kostareva, Kåre-Olav Stensløkken, Arnt Fiane, and Jarle Vaage. 2017. "Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification." *Journal of the American Heart Association* 6(9):1–23.

Salvatori, Marcus, Andrea Peloso, Ravi Katari, Shay Soker, Jan P. Lerut, Robert J. Stratta, and Giuseppe Orlando. 2015. "Semi-Xenotransplantation: The Regenerative Medicine-Based Approach to Immunosuppression-Free Transplantation and to Meet the Organ Demand." *Xenotransplantation* 22(1):1–6.

Schmidt, Dörthe and Simon P. Hoerstrup. 2005. "Tissue Engineered Heart Valves Based on Human Cells." *Journal of Clinical Epidemiology* 135:618–23.

Schoen, Frederick J. 2016. "Morphology, Clinicopathologic Correlations, and Mechanisms in Heart Valve Health and Disease." *Cardiovascular Engineering and Technology* 9(2):126–40.

Schoen, Frederick J. and Robert J. Levy. 2005. "Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress toward Understanding and Prevention." *Annals of Thoracic Surgery* 79(3):1072–80.

Scleicher, Martina, Hans Peter Wendel, Olaf Fritze, and Ulrich A. Stock. 2009. "In Vivo Tissue Engineering of Heart Valves: Evolution of a Novel Concept." *Regenerative Medicine* 4(4):613–19.

Seifert, Martina, Alexandra Bayrak, Meaghan Stolk, Naima Souidi, Maria Schneider, Ulrich A. Stock, and Kelvin G. M. Brockbank. 2015. "Xeno-Immunogenicity of Ice-Free Cryopreserved Porcine Leaflets." *Journal of Surgical Research* 193(2):933–41.

Singhal, Pooja, Adriana Luk, and Jagdish Butany. 2013. "Bioprosthetic Heart Valves: Impact of Implantation on Biomaterials." *ISRN Biomaterials* 2013:1–14.

Steenberghe, Mathieu Van, Thomas Schubert, Sébastien Gerelli, Caroline Bouzin, Yves Guiot, Daela Xhema, Xavier Bollen, Karim Abdelhamid, and Pierre Gianello. 2018. "Porcine Pulmonary Valve Decellularization with NaOH-Based vs Detergent Process : Preliminary in Vitro and in Vivo Assessments." 1–12.

Tarasoutchi, F., MW Montera, AIO Ramos, RO Sampaio, VEE Rosa, TAD Accorsi, ASSA Lopes, JRC Fernandes, LJT Pires, GS Spina, MLC Vieira, PL Lavitola, TC Bignoto, DJD Togna, ET Mesquita, WAM Esteves, FA Atik, AS Colafranceschi, VA Moisés, AT Kiyose, PMA Pomerantzeff, PA Lemos, FS Brito Jr, C. Weksler, CMA Brandão, R. Poffo, R. Simões, S. Rassi, PE Leães, R. Mourilhe-Rocha, JLB Pena, FB Jatene, MM Barbosa, JD Souza Neto, and JFK Saraiva. 2017. "Atualização Das Diretrizes Brasileiras de Valvopatias: Abordagem Das Lesões Anatomicamente Importantes." *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 109.

Turturici, Giuseppina, Rosaria Tinnirello, Gabriella Sconzo, and Fabiana Geraci. 2014. "Extracellular Membrane Vesicles as a Mechanism of Cell-to-Cell Communication: Advantages and Disadvantages." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 306(7):C621–33.

Vafae, Tayyeb, Daniel Thomas, Amisha Desai, Louise M. Jennings, Helen Berry, Paul Rooney, John Kearney, John Fisher, and Eileen Ingham. 2018. "Decellularization of Human Donor Aortic and Pulmonary Valved Conduits Using Low Concentration Sodium Dodecyl Sulfate." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 12(2):e841–53.

Vaturi, Mordehay, Leor Perl, Dorit Leshem-Lev, Oshrat Dadush, Tamir Bental, Yaron Shapira, Idit Yedidya, Gabi Greenberg, Ran Kornowski, Alexander Sagie, Alexander Battler, and Eli I. Lev. 2011. "Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients with Dysfunctional versus Normally Functioning Congenitally Bicuspid Aortic Valves." *American Journal of Cardiology* 108(2):272–76.

VeDepo, Mitchell C., Michael S. Detamore, Richard A. Hopkins, and Gabriel L. Converse. 2017. "Recellularization of Decellularized Heart Valves: Progress toward the Tissue-Engineered Heart Valve." *Journal of Tissue Engineering* 8:204173141772632.

Weber, Benedikt, Maximilian Y. Emmert, and Simon P. Hoerstrup. 2012. "Stem Cells for Heart Valve Regeneration." *Swiss Medical Weekly* 142(JULY):1–11.

Weinhaus, Anthony J. and Kenneth P. Roberts. 2005. "Anatomy of the Human Heart." *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices: Second Edition* 59–85.

Wendt, Sebastian, Andreas Goetzenich, Claudia Goettsch, Christian Stoppe, Christian Bleilevens, Sandra Kraemer, and Carina Benstoem. 2018. "Evaluation of the Cardioprotective Potential of Extracellular Vesicles – a Systematic Review and Meta-Analysis." *Scientific Reports* 8(1):1–14.

Wolf, Eckhard, Elisabeth Kemter, Nikolai Klymiuk, and Bruno Reichart. 2019. "Genetically Modified Pigs as Donors of Cells, Tissues, and Organs for Xenotransplantation." *Animal Frontiers* 9(3):13–20.

Wolf, Peter. 1967. "The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma." *British Journal of Haematology* 13:269–88.

Xie, Hui, Zhenxing Wang, Liming Zhang, Qian Lei, Aiqi Zhao, Hongxiang Wang, Qiubai Li, Yilin Cao, Wen Jie Zhang, and Zhichao Chen. 2017. "Extracellular Vesicle-Functionalized Decalcified Bone Matrix Scaffolds with Enhanced Pro-Angiogenic and Pro-Bone Regeneration Activities." *Scientific Reports* 7(March):1–13.

Yacoub, M. H. and J. J. M. Takkenberg. 2005. "Will Heart Valve Tissue Engineering Change the World?" *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2(2):60–61.

Yao, Yucheng, Brian J. Bennett, Xuping Wang, Michael E. Rosenfeld, Cecilia Giachelli, Aldons J. Lusis, and Kristina I. Boström. 2010. "Inhibition of Bone Morphogenetic Proteins Protects against Atherosclerosis and Vascular Calcification." *Circulation Research* 107(4):485–94.

Yip, Cindy Ying Yin, Jan Hung Chen, Ruogang Zhao, and Craig A. Simmons. 2009. "Calcification by Valve Interstitial Cells Is Regulated by the Stiffness of the Extracellular Matrix." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29(6):936–42.

Yutzey, Katherine E., Linda L. Demer, Simon C. Body, Gordon S. Huggins, Dwight A. Towler, Cecilia M. Giachelli, Marion A. Hofmann-Bowman, Douglas P. Mortlock, Melissa B. Rogers, Mehran M. Sadeghi, and Elena Aikawa. 2014. "Calcific Aortic Valve Disease: A Consensus Summary from the Alliance of Investigators on Calcific Aortic Valve Disease." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34(11):2387–93.

Zhao, Liang, Hong Li Chen, Li Qin Xie, Mian Wang, Xia Fei Li, Zhi Wei Feng, and Min Li. 2016. "Modification of Decellularized Vascular Scaffold with Conditioned Medium to Enhance Cell Reseeding." *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 27(11):1115–25.

Zheng, Ming Hao, J. Chen, Y. Kirilak, C. Willers, J. Xu, and D. Wood. 2005. "Porcine Small Intestine Submucosa (SIS) Is Not an Acellular Collagenous Matrix and Contains Porcine DNA: Possible Implications in Human Implantation." *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials* 73(1):61–67.

Zhou, Chun Xue, Dong Hui Zhou, Guang Xue Liu, Xun Suo, and Xing Quan Zhu. 2016. "Transcriptomic Analysis of Porcine PBMCs Infected with Toxoplasma Gondii RH Strain." *Acta Tropica* 154:82–88.

Zhou, H. P., D. H. Yi, S. Q. Yu, G. C. Sun, Q. Cui, H. L. Zhu, J. C. Liu, J. Z. Zhang, and T. J. Wu. 2006. "Administration of Donor-Derived Mesenchymal Stem Cells Can Prolong the Survival of Rat Cardiac Allograft." *Transplantation*

Proceedings 38(9):3046–51.

Zielinsky, Paulo. 1997. “Malformações Congênitas Fetais .” 69(nº 3).

ANEXO A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Received: 11 May 2018 | Revised: 21 August 2018 | Accepted: 3 September 2018
 DOI: 10.1111/xen.12464



ORIGINAL ARTICLE

WILEY Xenotransplantation

In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering

Marina Augusto Heuschkel¹ | Amanda Leitolis¹ | João Gabriel Roderjan² |
 Paula Hansen Suss² | César Augusto Oleinik Luzia² | Francisco Diniz Affonso da Costa² |
 Alejandro Correa¹ | Marco Augusto Stimamiglio¹

¹Laboratory of Basic Biology of Stem Cells, Carlos Chagas Institute, Fiocruz-Paraná, Curitiba, Brazil

²Pontifical Catholic University of Paraná—PUCPR, Curitiba, Brazil

Correspondence
 Alejandro Correa and Marco Augusto Stimamiglio, Laboratory of Basic Biology of Stem Cells, Carlos Chagas Institute, Fiocruz-Paraná, Curitiba, Brazil.
 Emails: alejandro.correa@fiocruz.br (AC); marco.stimamiglio@fiocruz.br (MA)

Funding information
 Brazilian National Health Fund, Grant/Award Number: 814611/2014; Araucária Foundation; CNPq

Abstract

Pericardial membrane derived from bovine heart tissues is a promising source of material for use in tissue-engineering applications. However, tissue processing is required for its use in humans due to the presence of animal antigens. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the structural integrity and biocompatibility of the bovine pericardium (BP) after a soft decellularization process with a 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution, with the aim to remove xenoantigens and preserve extracellular matrix (ECM) bioactivity. The decellularization process promoted a mean reduction of 77% of the amount of DNA in the samples in which cell nuclei staining was undetectable. The ECM content was maintained as mostly preserved after decellularization as well as its biomechanical properties. In addition, the decellularization protocol has proven to be efficient in removing the xenoantigen alpha-gal, which is responsible for immune rejection. The decellularized BP was noncytotoxic in vitro and allowed human adipose-derived stem cell (hASC) adhesion. Finally, after 7 days in culture, the tissue scaffold became repopulated by hASCs, and after 30 days, the ECM protein pro-collagen I was seen in the scaffold. Together, these characteristics indicated that soft BP decellularization with 0.1% SDS solution allows the acquirement of a bioactive scaffold suitable for cell repopulation and potentially useful for regenerative medicine.

KEYWORDS

bovine pericardium, decellularization, extracellular matrix, tissue engineering

1 | INTRODUCTION

Animal tissues as bovine pericardium (BP) are extensively used as scaffolds to repair/regenerate damaged tissues in humans. Considering its natural collagen and elastin fibers, which provide valuable mechanical and nonthrombogenic properties, BP has been

considered the gold standard source of material for cardiovascular surgeons.¹ Despite their availability and biocompatibility, BP scaffolds are commonly cross-linked in order to increase stability and immune compatibility. However, tissue fixation treatments may increase calcification and limit recipient cellular ingrowth.²⁻⁴

Decellularization is a tissue-engineering technique that consists of the removal of cellular and nuclear material, but preserves the composition, biological activity, and mechanical integrity of the remaining ECM.^{5,6} In practice, this means maximizing the removal of cellular material and minimizing the loss of ECM. Use of ECM derived

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; H&E, hematoxylin and eosin; hASC, human adipose-derived stem cell; PBS, phosphate-buffered saline; PFA, paraformaldehyde; PUCPR, Pontifical Catholic University of Paraná; SDS, sodium dodecyl sulfate; SEM, scanning electron microscopy.


Received: 27 October 2018 | Revised: 3 January 2019 | Accepted: 21 January 2019

DOI: 10.1111/xen.12503

ORIGINAL ARTICLE

WILEY Xenotransplantation

Structural assessments in decellularized extracellular matrix of porcine semilunar heart valves: Evaluation of cell niches

João Gabriel Roderjan¹  | Lúcia de Noronha² | Marco Augusto Stimamiglio³ |
 Alejandro Correa³ | Amanda Leitolis³ | Ronaldo Rocha Loures Bueno⁴ |
 Francisco Diniz Affonso da Costa⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

²Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

³Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR, Curitiba, Brazil

⁴Setor de Medicina Interna, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

⁵Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

Correspondence

João Gabriel Roderjan, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.
 Email: gabriel.roderjan@pucpr.br

Abstract

Tissue-engineered heart valves aim to reproduce the biological properties of natural valves with anatomically correct structure and physiological performance. The closest alternative to creating an ideal heart valve substitute is to use decellularized porcine heart valves, due to their anatomy and availability. However, the immunological barrier and the structural maintenance limit the long-term physiological performance of decellularized porcine heart valves. This study investigated the extracellular matrix (ECM) structure of aortic and pulmonary porcine valves decellularized by a low concentration sodium dodecyl sulfate (SDS)-based method in order to determine the ECM scaffold (ECMS) conditions related to remodeling potential. To assess the structures of the leaflets and conduits of the heart valves, ECM components and their organization were evaluated by histology, biochemical analysis (BC), scanning electron microscopy, multiphoton microscopy, tensile test, immunofluorescence labeling (IF), and Raman microspectroscopy used to draw a profile of the cell niches. Histology and multiphoton imaging of decellularized aortic and pulmonary leaflets and conduits revealed a collagen and elastin histoarchitecture with rearrangement, loosening fibers, and glycosaminoglycan depletion confirmed by biochemistry quantification. The potential cytotoxicity of SDS residues was eliminated after 10 wash cycles. The mechanical properties of the structure of the valve indicated a functional resistance of decellularized ECM. The IF demonstrated the presence of basement membrane, suggesting a potential structure for host cell attachment. The RM analysis showed evidence of molecular interactions, suggesting conservation of the chemical composition, particularly among the protein molecular structures. The structural analyses performed in the semilunar porcine heart valves demonstrate that decellularized ECMS has structural properties that support physiological performance and potential host tissue integration. In fact, decellularized leaflet scaffolds were prone to cell interaction after human adipose-derived stromal cell seeding and culturing. Further analysis of biocompatibility, particularly the ECM-cell interaction, can elucidate the remodeling process, in preserved decellularized heart valve scaffold.



Cardiomyogenesis Modeling Using Pluripotent Stem Cells: The Role of Microenvironmental Signaling

Amanda Leitolis[†], Anny W. Robert[†], Isabela T. Pereira[†], Alejandro Correa and Marco A. Stimamiglio

Stem Cell Basic Biology Laboratory, Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ-PR, Curitiba, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Katiucia Batista Silva Paiva,
University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:

Steven Olive Greenway,
University of Calgary, Canada
Carolyn Carr,
University of Oxford, United Kingdom

*Correspondence:

Amanda Leitolis
aleitolis@gmail.com
Anny W. Robert
anny.robert@fiofcrz.br
Isabela T. Pereira
isaabola@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Stem Cell Research,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 31 May 2019

Accepted: 29 July 2019

Published: 09 August 2019

Citation:

Leitolis A, Robert AW, Pereira IT,
Correa A and Stimamiglio MA (2019)
Cardiomyogenesis Modeling Using
Pluripotent Stem Cells: The Role
of Microenvironmental Signaling.
Front. Cell Dev. Biol. 7:164.
doi: 10.3389/fcell.2019.00164

Pluripotent stem cells (PSC) can be used as a model to study cardiomyogenic differentiation. *In vitro* modeling can reproduce cardiac development through modulation of some key signaling pathways. Therefore, many studies make use of this strategy to better understand cardiomyogenesis complexity and to determine possible ways to modulate cell fate. However, challenges remain regarding efficiency of differentiation protocols, cardiomyocyte (CM) maturation and therapeutic applications. Considering that the extracellular milieu is crucial for cellular behavior control, cardiac niche studies, such as those identifying secreted molecules from adult or neonatal tissues, allow the identification of extracellular factors that may contribute to CM differentiation and maturation. This review will focus on cardiomyogenesis modeling using PSC and the elements involved in cardiac microenvironmental signaling (the secretome – extracellular vesicles, extracellular matrix and soluble factors) that may contribute to CM specification and maturation.

Keywords: cardiomyocytes, pluripotent stem cell, secretome, cell differentiation, maturation

INTRODUCTION

Pluripotent stem cells (PSC), both embryonic stem cells (ESC) and induced pluripotent stem cells (iPSC), show strong potential to proliferate and differentiate. PSC have already been successfully differentiated into a number of cell types, including cardiomyocytes (CM) (Murry and Keller, 2008). Key events that regulate lineage commitment can be reproduced *in vitro* and used as a model to study cardiomyogenesis, to generate CMs and produce clinically relevant cell populations, and to evaluate cardiac toxicity or model congenital abnormalities (Kehat et al., 2001; Xu et al., 2002; Laflamme et al., 2007; Kattman et al., 2011; Burrage et al., 2012). Despite the advances in this field, new challenges are emerging, mainly related to cardiac differentiation efficiency and the functional maturation of human PSC-derived cardiomyocytes (hPSC-CM).

This review discusses cardiac differentiation and hPSC-CM maturation approaches that use extracellular components of the cardiac microenvironment. Initially, an overview of hPSC cardiomyogenic differentiation protocols was described, indicating some of the essential signaling pathways that control CM commitment. However, the main focus is to explore the cardiac niche, its components and the strategies developed to mimic its complexity *in vitro*. After a brief description of important signals and interactions available in a tissue niche, we emphasize aspects related to cardiac extracellular matrix (ECM; composition or structure), soluble factors and extracellular vesicles (EVs) that could influence *in vitro* CM differentiation and maturation.



Article

Human Heart Explant-Derived Extracellular Vesicles: Characterization and Effects on the In Vitro Recellularization of Decellularized Heart Valves

Amanda Leitolis ¹ , Paula Hansen Suss ², João Gabriel Roderjan ³, Addeli Bez Batti Angulski ¹, Francisco Diniz Affonso da Costa ², Marco Augusto Stimamiglio ¹ and Alejandro Correa ^{1,*}

¹ Laboratory of Basic Biology of Stem Cells, Carlos Chagas Institute, Fiocruz-Paraná, Curitiba 81350-010, Brazil; aleitolis@gmail.com (A.L.); addeli.angulski@gmail.com (A.B.B.A.); marco.stimamiglio@fiocruz.br (M.A.S.)

² Pontifical Catholic University of Paraná—PUCPR, Curitiba 80215-901, Brazil; paula.h@pucpr.br (P.H.S.); costa.f@pucpr.br (F.D.A.d.C.)

³ Technological Federal University of Paraná—UTFPR, Curitiba 80230-901, Brazil; gabrielrdm@gmail.com

* Correspondence: alejandro.correa@fiocruz.br; Tel.: +55-41-3316-3231

Received: 5 February 2019; Accepted: 1 March 2019; Published: 14 March 2019



Abstract: Extracellular vesicles (EVs) are particles released from different cell types and represent key components of paracrine secretion. Accumulating evidence supports the beneficial effects of EVs for tissue regeneration. In this study, discarded human heart tissues were used to isolate human heart-derived extracellular vesicles (hH-EVs). We used nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM) to physically characterize hH-EVs and mass spectrometry (MS) to profile the protein content in these particles. The MS analysis identified a total of 1248 proteins. Gene ontology (GO) enrichment analysis in hH-EVs revealed the proteins involved in processes, such as the regulation of cell death and response to wounding. The potential of hH-EVs to induce proliferation, adhesion, angiogenesis and wound healing was investigated in vitro. Our findings demonstrate that hH-EVs have the potential to induce proliferation and angiogenesis in endothelial cells, improve wound healing and reduce mesenchymal stem-cell adhesion. Last, we showed that hH-EVs were able to significantly promote mesenchymal stem-cell recellularization of decellularized porcine heart valve leaflets. Altogether our data confirmed that hH-EVs modulate cellular processes, shedding light on the potential of these particles for tissue regeneration and for scaffold recellularization.

Keywords: human heart; tissue explant; extracellular vesicle; heart valve; tissue engineering; recellularization; cardiac regions; mesenchymal stromal cells

1. Introduction

A wide variety of cell types, such as cardiomyocytes, endothelial cells, smooth muscle cells and cardiac resident stromal cells (CRSCs), such as fibroblasts and stem/progenitor cells, are found in the adult heart [1,2]. CRSCs have been isolated and characterized by the ex vivo culture of cardiac explants [3–5]. The conditioned media from cultured CRSCs exhibits cardioprotective and regenerative capabilities, being able to drive proliferation, cardiac differentiation and tube formation in endothelial cells [4]. Similarly, studies with cardiosphere-derived cells (CDCs) have also pointed out the beneficial effects on cardiac cells and heart function [6], CDCs lead to myocardial regeneration and functional improvement of the heart when injected into infarcted mice [7]. A key component of paracrine secretion is the heterogeneous population of small membranous particles, called extracellular vesicles (EVs), which are released by cells. According to their size and origin, EVs can be classified into exosomes, endocytic origin and diameter of 30–100 nm; microvesicles, plasma membrane budding origin and

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento que você está lendo é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Ele contém explicações sobre o estudo que você está sendo convidado(a) a participar. Antes de decidir se deseja participar (de livre e espontânea vontade) você deverá ler e compreender todo o conteúdo. Ao final, caso decida participar, você será solicitado(a) a assiná-lo e receberá uma cópia do mesmo, de igual teor. Antes de assinar faça perguntas sobre tudo o que não tiver entendido bem. A equipe deste estudo responderá às suas perguntas a qualquer momento (antes, durante e após o estudo). Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade, bastando para isso entrar em contato com um dos pesquisadores responsáveis.

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), em uma pesquisa científica chamada: **"Caracterização de enxertos valvares porcinos obtidos por dois processos de descélularização e avaliação da sua biocompatibilidade *in vitro* usando células humanas e vesículas extracelulares"**. Essa pesquisa procura caracterizar enxertos de válvula cardíaca pulmonar porcina que passaram por um procedimento de remoção das células. Para estudar a biocompatibilidade dos tecidos produzidos um parâmetro importante é a avaliação da resposta imune celular humana, por isso precisamos coletar o sangue venoso para o isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

Caso você decida aceitar o convite, nós faremos uma coleta simples de sangue venoso, em torno de 40 mL, em recipiente apropriado para a realização dos experimentos. As amostras não serão utilizadas para nenhum fim terapêutico e não terão nenhum valor comercial.

Riscos: O risco associado a esse tipo de coleta é a possibilidade de ocorrer um pequeno derrame local (hematoma), que geralmente não tem consequências além de um pequeno desconforto.

Benefícios: você não terá nenhum benefício direto e imediato com a participação neste projeto.

Todas as informações obtidas serão sigilosas. As células isoladas serão imediatamente isoladas e utilizadas para os experimentos. A divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, entretanto, ele mostrará apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição a qual pertence ou qualquer informação que esteja relacionada com sua privacidade. Ainda assim, há riscos de quebra de confidencialidade acidental e a equipe estará esforçada em corrigir qualquer eventualidade, e ressarcir qualquer dano que essa falha possa ocasionar.

Conforme previsto pelas normas brasileiras de pesquisa com a participação de seres humanos você não receberá nenhum tipo de compensação financeira pela sua participação neste estudo.

Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização.

Após ser esclarecido(a), no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento e rubrique as duas folhas no rodapé. Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Amanda Leitolis, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775, Curitiba, PR, (41) 3316-3230, aleitolis@gmail.com.

Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo você deve ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz pelo telefone: (21) 3882-9011 ou mandar um e-mail para cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.

Você confirma que foi devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo pesquisador sobre a pesquisa: **"Caracterização de enxertos valvares porcinos obtidos por dois processos de descelularização e avaliação da sua biocompatibilidade *in vitro* usando células humanas e vesículas extracelulares"**, dos procedimentos nela envolvidos, assim como dos possíveis riscos e benefícios decorrentes de sua participação. É garantido que você pode retirar seu consentimento a qualquer momento, sem que isso lhe traga prejuízo ou penalidade.

Curitiba, ____ / ____ / ____ .

Nome, Assinatura e CPF do(a) participante

Assinatura do pesquisador responsável e CPF

